



Universitat de Lleida

PREMIS A TREBALLS DE RECERCA DE LA UdL
per a l'estudiantat de batxillerat i cicles formatius de grau superior

**Més que un conreu.
L'arròs transgènic contra la coccidiosi**

Laura Vilella Grau

Centre: Institut Torre Vicens de Lleida

Tutora: Sole Maresma Ribes

Tutores Itinera: Teresa Capell Capell i Carmina Nogareda Burch

Data: novembre, 2020

MÉS QUE UN CONREU

L'ARRÒSTRASNGÈNIC CONTRA LA
COCCIDIOSI



TREBALL DE RECERCA CURS 2019-2020

AGRAÏMENTS

Aquest treball no hauria estat possible sense tot el recolzament que he rebut. Poder formar part d'un equip d'investigació que em va oferir amplis coneixements i un gran suport, va significar una oportunitat genial per a desenvolupar aquest treball amb èxit i fluïdesa. Dono gràcies a la meua família i amics per motivar-me a seguir amb aquest projecte. També agraeixo el suport de la meua tutora. I sobretot, vull fer una menció especial a les meves tutores durant el projecte ITINERA i a tot l'equip del laboratori, que van brindar-me sempre la seva ajuda.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. MOTIVACIÓ	5
1.2. HIPÒTESIS:	5
1.3. MARC TEÒRIC	6
1.3.1. INICIS DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL	6
1.3.2. TRANSGÈNICS	6
1.3.2.1. DEFINICIÓ	6
1.3.2.2. EL PER QUÈ DELS TRANSGÈNICS	7
1.3.2.2.1. IMPORTÀNCIA DELS TRANSGÈNICS EN LA PRODUCCIÓ I EL DESENVOLUPAMENT	7
1.3.3. MOLECULAR PHARMING	7
1.3.3.1. UTILITZACIÓ EN INVESTIGACIÓ	8
1.4. LA COCCIDIOSI	8
1.5. EIMERIA, LA IMPORTÀNCIA DE LA INVESTIGACIÓ	8
1.6. CONCEPTES PER VEURE	9
1.7. OBJECTIUS A ASSOLIR	9
2. TRANSGÈNICS	10
2.1. ELS TRANSGÈNICS	10
2.2. USOS DE LES PLANTES MODIFICADES GENÈTICAMENT	12
2.3. EDIBLE VACINES	13
2.4. L'ARRÒS TRANSGÈNIC	14
2.4.1. ANATOMIA DE L'ARRÒS	14
2.5. NORMATIVA EUROPEA	17
3. COCCIDIOSI	18
3.1. EL PARÀSIT: EIMERIA TENELLA	19
3.2. AFECTACIÓ EN LES AUS	20
3.2.1. SISTEMA DIGESTIU DE LES AUS DE CORRAL	21
3.3. TRACTAMENT DE LA MALALTIA	22
3.3.1. VACUNES PER A LA COCCIDIOSIS	22
4. INTRODUCCIÓ DEL GEN EIMIC A L'INTERIOR DE LA PLANTA D'ARRÓS (TRANSFORMACIÓ DE L'ARRÓS)	24
4.1. PROCES DE PREPARACIÓ DELS EMBRIONS	24
4.1.1. CULTIU IN VITRO DE L'ARRÒS	24
4.1.1.1. PREPARACIÓ DE LES LLAVORS D'ARRÒS	25
4.1.1.2. INICI DE L'ETAPA FOSCA:	26
4.1.1.2.1. MSP (PROLIFERATION MEDIUM)	26

4.1.1.2.2.	MSO (OSMOTICUM).....	27
4.2.	PREPARACIÓ DE LA GOLD PREPARATION	28
4.2.1.	AMPLIFICACIÓ DEL GEN PER PCR	28
4.2.1.1.	MATERIALS I MÈTODES.....	31
4.2.2.	SELECCIÓ DEL PLASMIDI	39
4.2.3.	LLIGACIÓ DEL GEN AL VECTOR	41
4.2.3.1.	FUTURES OBSERVACIONS	42
4.2.4.	TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS.....	43
4.2.4.1.	PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS	43
4.2.4.2.	INTRODUCCIÓ DEL PLASMIDI A LA CÈL·LULA COMPETENT ...	46
4.2.5.	SELECCIÓ I PREPARACIÓ DE LES COLÒNIES.....	47
4.2.5.1.	AMPICIL·LINA LB PLATES	49
4.2.5.2.	IPTG/ Xgal / Amp LB PLATES.....	52
4.2.6.	DIGESTIÓ ENZIMÀTICA I PCR	54
4.2.7.	SEQÜENCIACIÓ DE SANGER	59
4.2.8.	PREPARACIÓ DELS MICROPROJECTILS	61
4.3.	BOMBARDEIG.....	62
5.	EXPRESSIÓ I DETECCIÓ DEL GEN A L'ARRÒS TRANSFORMAT.....	65
5.1.	REGENERACIÓ DE LA PLANTA AMB LA MOLÈCULA	65
5.1.1.	ETAPA FOSCA DESPRÉS DEL OSMOTICUM.....	65
5.1.1.1.	MSP (PROLIFERATION MEDIUM)	65
5.1.1.2.	SELECCIÓ DELS CALLS	65
5.1.2.	ETAPA LLUMINOSA	68
5.1.2.1.	MSR (REGENERATION).....	68
5.1.2.2.	ROOTING:.....	69
5.1.2.3.	TRASPÀS AL SÒL:	69
5.2.	DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA AMB ELISA	71
5.2.1.	TÈCNICA ELISA.....	71
5.2.2.	LECTURA DE L'ELISA AMB ESPECTROFOTÒMETRE	76
5.3.	DETECCIÓ DE LA PROTEÏNA AMB WESTERN BLOT	77
5.3.1.	WESTERN BLOT	77
6.	ANÀLISI DE RESULTATS	80
6.1.	PCR.....	80
6.2.	DIGESTIÓ	81
6.3.	ELISA	82
6.4.	WESTERN.....	85
6.5.	EMBRIOGÈNESIS.....	86

7. DISCUSSIÓ	87
8. PROPOSTA D'ADMINISTRACIÓ	88
9. CONCLUSIÓ	91
10. REFERÈNCIES	93
11. ANNEXOS	97

1. INTRODUCCIÓ

Les plantes. De vegades, quan pensem en aquesta paraula ens imaginem el roser que té la nostra àvia al balcó de casa, o aquella orquídia que li vam regalar a la mare pel seu aniversari. Però la veritat és que les plantes i la seva modificació genètica són molt més importants per a la vida del que ens imaginem.

A la gran majoria de la gent, quan se'ls apareix la paraula "transgènic" no els sona a quelcom beneficiós. Tot i ser un terme molt innovador, les modificacions genètiques i la manipulació de vegetals i organismes per al desenvolupament de la població venen acompanyant-nos des dels inicis de la humanitat.

1.1. MOTIVACIÓ

Aquest treball rau de l'impuls que em generen les incògnites del món vegetal i els passos de gegant amb què avança dia a dia la investigació transgènica. Es mou per les ganes de prendre consciència d'aquest món tan desconegut dels OMG i l'emoció que m'ha creat poder aportar el meu gra de sorra en una investigació real, envoltada de grans investigadors i investigadores que dia rere dia treballen en projectes fascinants per a la millora de la qualitat de vida, i per a poder crear una perspectiva de futur, tan incert i no escrit, que ens espera a les generacions més joves.

1.2. HIPÒTESIS:

- Es pot produir una proteïna en una planta que pugui ser utilitzada com a vacuna contra una malaltia en animals.
- La vacuna utilitzada tindrà més efectivitat i menys cost que els fàrmacs amb ovo-immunització en bacteris.
- El gen utilitzat (EtMIC) produirà l'aparició d'anticossos específics en l'animal.
- L'arròs tindrà un procés de transformació més senzill que la recombinació d'esporezous.

1.3. MARC TEÒRIC

1.3.1. INICIS DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Els primers homínids, amb els descobriment del foc i la invenció de les primeres eines de treball i armes, van començar una carrera tecnològica i científica imparabile. Amb el naixement de l'agricultura i ramaderia (“domesticació” de plantes i animals) va comportar el desenvolupament de la humanitat. La producció agrària i ramadera ha incorporat al mercat la major part de productes alimentaris, farmacèutics, industrials, energètics... A partir d'aquesta aquesta domesticació va sorgir una nova disciplina científica, la biotecnologia.

“La introducció de l'agricultura i la ramaderia han permès un increment espectacular i sostingut de la qualitat de vida”. Bueno Torrens, D. (2011). *¿Para qué sirven los transgénicos?*. Barcelona: Universitat de Barcelona, Publicacions i Edicions.

La biotecnologia és un terme que es descriu, segons el conveni de diversitat Biològica de les Nacions Unides 1993, com a *“tota aplicació tecnològica que utilitzi sistemes biològics i organismes vius o els seus derivats per a la creació o modificació de productes o processos per a usos específics”*. És a dir, la biotecnologia engloba la capacitat de modificar i millorar organismes vius per a un fi. La petjada que ha deixat la intervenció humana ha quedat reflectida en els genomes de les espècies que hem domesticat. Quan parlem de domesticació ens referim a la desaparició dels gens egoistes de l'espècie silvestre (llavors amb grans filaments per a una gran dispersió, amb alts continguts de productes tòxics per a la seva supervivència dels seus gens...) en benefici als gens egoistes de la nostra pròpia espècie (l'agricultura té com a finalitat el benefici dels humans). L'increment de les espècies domesticades ha aparegut gràcies a l'intens esforç de la selecció, manteniment i creuament de les espècies que han aparegut naturalment al llarg dels anys.

1.3.2. TRANSGÈNICS

1.3.2.1. DEFINICIÓ

Els transgènics (organismes genèticament modificats) apareixen en la naturalesa per si sols. Tot i que entenem que la variabilitat genètica en la natura s'obté per mutacions, també existeixen altres mecanismes que produeixen un canvi en el DNA el qual adquireix gens i propietats d'altres espècies.

Per exemple: el 13% del genoma del moniato prové d'altres espècies, incloent bacteris com el *Bacillus thuringiensis*.

1.3.2.2. EL PER QUÈ DELS TRANSGÈNICS

L'objectiu de la generació de transgènics és conferir característiques d'interès per als humans. Tots els éssers vius de l'escala evolutiva es poden modificar genèticament, és a dir, des de bacteris a mamífers, incloent fongs, virus, insectes, peixos, plantes... La utilització d'organismes genèticament modificats no és exclusiva d'aquest segle; com ja hem vist, els transgènics porten acompanyant-nos en la natura des de fa milers d'anys, però l'impuls per donar nom a aquest terme és produït a mitjats del segle XX en l'anomenada Revolució Verda. Aquesta es defineix com el projecte impulsat per la FAO per al desenvolupament i expansió de llavors modificades genèticament i tècniques agràries d'altres productivitats, amb objectiu d'aconseguir que les regions més pobres del món poguessin autoabastir-se d'aliments d'origen vegetal. 20 anys després de la revolució verda el projecte havia assolit els resultats esperats amb un increment en la producció de panís del 208% (1960-2000).

1.3.2.2.1. IMPORTÀNCIA DELS TRANSGÈNICS EN LA PRODUCCIÓ I EL DESENVOLUPAMENT

Els microorganismes modificats tenen una gran importància en la investigació científica. L'any 1982 es creà la insulina produïda en bacteris, concretament l'*Escherichia coli*. Actualment la utilització de bacteris, llevats i cèl·lules de mamífers modificades genèticament s'utilitzen en diversos productes farmacològics d'origen humà (hormones de creixement, vacunes, factors de coagulació...).

A més a més de la producció agrícola, la modificació de les plantes degut a la seva efectivitat, facilitat de modificació i poder curatiu (principis actius) també foren i són molt utilitzades com a recursos farmacològics i per a la producció de vacunes comestibles.

1.3.3. MOLECULAR PHARMING

El regne vegetal és considerat constituent d'una immensa reserva de la qual podem extreure milers de medicaments per curar infinitat de malalties.

A aquest concepte se l'anomena com a molecular pharming o agricultura molecular que es defineix com a una de les aplicacions de la biotecnologia per a la producció de proteïnes per a usos medicinals en plantes conreables. Mitjançant les plantes es produïen medicaments amb patògens animals i vegetals sense ser contaminats.

1.3.3.1. UTILITZACIÓ EN INVESTIGACIÓ

Un exemple d'aquesta modificació del regne vegetal per a la seva utilització com a biofàctria de productes farmacèutics seria la desenvolupada per l'Institut de Biologia Molecular de Plantes de València, amb la generació de tomateres transgèniques per a la producció de productes farmacològics de consum oral (ex. Vacunes o anticossos per a teràpies immunològiques orals). La característica més destacable de les tomateres ha estat el seu destacat color blau, atorgat pel canvi de les zones reguladores de gens de la pròpia tomatera a fi que en un futur determinades proteïnes colorades s'expressin.

Un altre exemple destacable del molecular pharming seria el projecte desenvolupat per la Universitat de Lleida en el qual col·laboren més de 39 equips europeus i sud-africans. El projecte ha consistit en l'elaboració d'una varietat de panís transgènic productor d'un tipus específic d'anticossos contra el virus de la sida. Aquests anticossos serien utilitzats com a fàrmac aplicable en forma de pomada per a la prevenció per contagi via genital, però no per a curar les persones ja infectades amb el virus.

1.4. LA COCCIDIOSI

La coccidiosi és una malaltia causada pel protozou *Eimeria*. Afecta majoritàriament a les cries d'aus de corral. Aquesta és molt infecciosa originant alts graus de mortalitat en aquesta espècie animal.

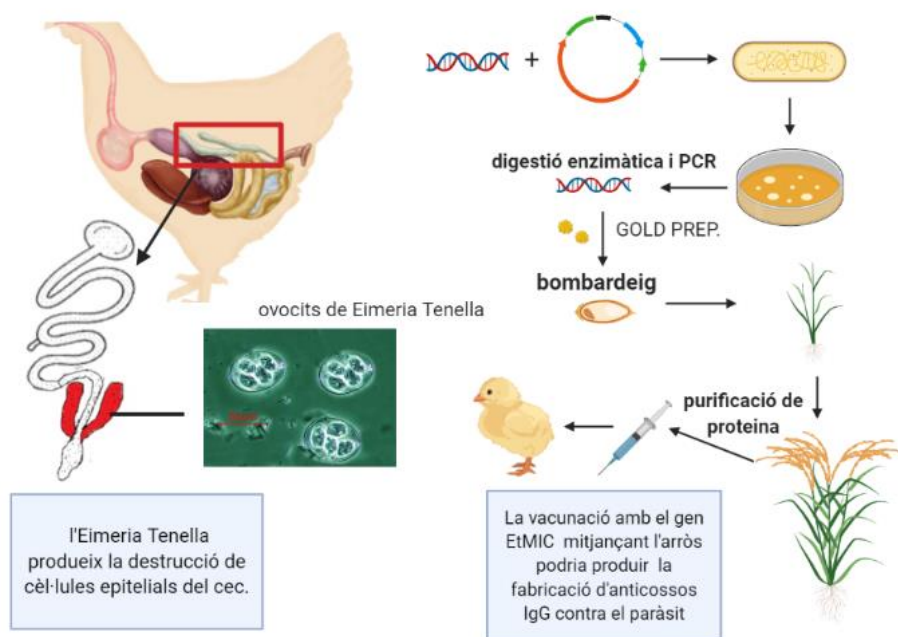
1.5. EIMERIA, LA IMPORTÀNCIA DE LA INVESTIGACIÓ

Aquesta malaltia causa un gran impacte econòmic mundial en els pollastres, una pèrdua de 3 milions de dòlars a nivell mundial (Qi et al., 2013). L'actual tractament per a la coccidiosi ha produït l'aparició d'*Eimeria* resistents a aquests, produint un increment de nou en la mortalitat dels pollastres.

Aquesta investigació mitjançant l'arròs transgènic com a protagonista es realitza per a la producció d'una vacuna comestible, que sigui efectiva i amb un cost menor.

1.6. CONCEPTES PER VEURE

En aquest Treball de Recerca trobareu una explicació avançada del molecular pharming utilitzant l'arròs com a base vegetal modificada per a la producció d'un antigen per a la cura d'una malaltia d'origen parasitari com és la coccidiosi. També es podrà observar de prop el funcionament d'un laboratori, els processos detallats de producció de transgènics amb la seva anàlisi de resultats, i com es podria aplicar als animals en un futur aquesta proteïna produïda farmacològicament. Finalment, s'analitzaran les hipòtesis plantejades i els resultats experimentals extraient les conclusions.



Il·lustració 1. Esquema del procés de transformació de l'arròs i de conceptes de la coccidiosi

1.7. OBJECTIUS A ASSOLIR:

Els objectius que es volen assolir en aquesta recerca són:

- Producció d'una proteïna per a l'elaboració d'una vacuna mitjançant una planta transgènica (arròs) per poder tractar la coccidiosi.
- Quantificació de la proteïna produïda per tal d'avaluar si és econòmica la seva producció.
- Possible formulació i identificació de la via d'administració del fàrmac en els animals (aus).
- Comparació amb els altres sistemes de producció del mateix fàrmac.

2. TRANSGÈNICS

2.1. ELS TRANSGÈNICS

Els avenços en la biotecnologia vegetal i l'enginyeria genètica han fet possible la manipulació genòmica per a la integració de DNA específic, produint la creació de nous organismes no presents en la natura, és a dir, transgènics.

Es coneix com a transgènic o organisme modificat genèticament (OMG) aquells organismes que mitjançant l'enginyeria genètica incorporen gens exògens o altres tipus d'organismes, per a l'expressió d'un caràcter específic.

L'enginyeria genètica permet la utilització de tècniques específiques per a la introducció d'un gen en el genoma d'una cèl·lula hoste, la seva expressió i la regeneració d'un nou individu que presenti la característica addicional que li ha proporcionat aquest gen.

Aquests OMG es produeixen mitjançant tècniques de DNA recombinat. Les plantes transgèniques formen part dels organismes modificats genèticament. Aquestes incorporen el material genètic de manera artificial, és a dir, la pol·linització no actua per a transmetre'ls.

Els gens inclosos, anomenats transgens, poden ser procedents d'una altra planta no emparentada, o bé d'una altra espècie (fongs, animals, bacteries, virus...). Aquests quan s'introdueixen en el genoma passen a formar part de la planta i de les seves descendents. Cal recordar que existeix la possibilitat de mutació natural degut a la recombinació genètica.

Els cultius transgènics, tot i el seu caràcter innovador, porten acompanyant-nos des dels inicis. Els cereals, degut a la seva importància en la base alimentària són el tipus de planta amb què més es va investigar durant el segle XX. Tot i l'avanç que va suposar la revolució verda, no es va ampliar la investigació de plantes transgèniques fins a finals de segle, i es van descobrir aplicacions a més a més de l'àmbit de l'agricultura, en la salut mediambiental i l'alimentació. Però no fou fins als anys 80 quan una col·laboració entre equips estatunidencs, de Bèlgica i de l'empresa Monsanto produí el descobriment de la introducció de DNA bacterià en les plantes i d'aquesta manera, de les plantes transgèniques.

El descobriment d'enzims de restricció i el desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant han promulgat l'aplicació de diferents tècniques de producció de plantes transgèniques amb àmplies varietats d'aplicacions. Per a poder desenvolupar

correctament aquests processos fou necessari el desenvolupament i millora dels mètodes de cultiu in vitro de teixits vegetals.

L'obtenció de plantes transgèniques es dona a lloc a través d'un organisme donant del gen d'interès i una planta receptora d'aquest i capaç de poder regenerar-se. La producció d'una planta modificada genèticament consta de diferents fases, que són:

- Identificar una característica en l'organisme d'origen.
- Detectar el gen d'interès i aïllar-lo.
- Combinació del gen amb mitjans per a la seva manipulació (vectors).
- Transformació: mètode d' introducció del gen a l'interior de l'organisme d'interès.
- Selecció: detecció de les cèl·lules transformades amb èxit.
- Regeneració: obtenció de la planta completa a partir de les cèl·lules.
- Creixement i reproducció de l'organisme modificat.



Il·lustració 2. Representació de planta transgènica.

2.2. USOS DE LES PLANTES MODIFICADES GENÈTICAMENT

Les plantes transgèniques, presenten una àmplia varietat d'usos en diferents àmbits.

Els més destacables són:

- ❖ Augment de l'activitat agrícola: l'adició de vectors els quals produeixen la resistència a plagues i a herbicides produeix un augment en els beneficis dels conreus. Les plantes transgèniques són utilitzades per a augmentar la productivitat dels camps. Espanya és un dels països amb més conreus de panís transgènic d'Europa. Alguns països utilitzen els conreus per alimentar a la població, mentre que d'altres com aliment per al bestiar.
- ❖ Millora de la qualitat dels aliments: mitjançant l'ús de OMG a més a més d'augmentar la producció d'aliment, produeixen l'augment de la qualitat i valor nutricional. L'insert produeix la creació d'aliments més saludables i segurs.
- ❖ Producció de vacunes i medicaments: producció de proteïnes mitjançant les plantes per a la seva utilització com a vacuna o medicament.
- ❖ Fitoremediació: la Fitoremediació és la descontaminació del sòl i la reducció de diversos compostos tòxics que es produeixen per processos bioquímics de plantes. La Fitoremediació permet produir una plantació en terrenys contaminats per residus industrials, deixant que les plantes acumulin metalls pesants o molècules orgàniques tòxiques per més tard poder tornar a cultivar.
- ❖ Producció de plàstics: plantes transgèniques que produeixen enzims útils en la indústria. Una d'aquestes aplicacions és la producció de bioplàstics reutilitzables a partir de les plantes.

2.3. EDIBLE VACINES

Les vacunes comestibles, és a dir, produïdes mitjançant la modificació genètica de plantes està convertint-se en una de les branques més notables de la vacunologia. La modificació d'organismes permet la introducció de l'antigen candidat a l'espècie de planta seleccionada. Aquesta introducció es pot donar mitjançant el mètode de *Biolística* o a través d'un vector mediat (*Agrobacterium*).

La gran majoria de plantes transgèniques són utilitzades per a la producció i investigació de vacunes. Quan els compostos sintetitzats a través de les plantes són d'interès terapèutic, s'anomena a aquest procés Molecular Pharming (agricultura molecular).

El desenvolupament de vacunes comestibles d'ús veterinari ha produït un avenç històric en la millora de la investigació de malalties en animals.

La producció de diversos antígens en plantes transgèniques produï un gran interès en l'elaboració de vacunes comestibles. La possibilitat de sintetitzar proteïnes immunològiques del patògen en plantes per utilitzar el seu teixit cel·lular com a vacuna tant en animals com humans dona lloc a la viabilitat d'aquest procés utilitzant diferents tipus de proteïnes bacterianes i virals.

Cal recordar que una vacuna és una preparació destinada a generar la immunitat adquirida d'una malaltia específica, estimulants l'aparició d'anticossos. Les vacunes poden ser de diferents tipus:

- Atenuades: microorganismes que no presenten les seves propietats patògenes però produeixen la reacció del sistema immunitari.
- Inactives: presenten microorganismes perjudicials que mitjançant processos químics mantenen la seva estructura però no el seu patògen.
- Toxoides: components tòxics inactivats de microorganismes.
- Recombinant: utilitzen parts específiques del germen (proteïnes) per a produir la resposta immunitària.

El sistema immunitari reconeix els components de la vacuna com a nocius per a l'organisme, consegüentment destrueixen aquests components elaborant l'augment d'anticossos específics en l'organisme contra aquesta malaltia. Quan la infecció arriba a l'organisme, el sistema immunitari està preparat per a la resposta immunitària.

La quantitat de teixit necessari per a una dosi d'una vacuna és molt petita. Consegüentment, els nivells d'expressió de l'antigen en el teixit vegetal són molt importants.

Actualment la vacunació es troba amb una sèrie de dificultats: els costos de producció i el risc de distribució en zones de difícil accés mèdic. L'OMS (Organització Mundial de la Salut) va realitzar un estudi en el qual la quantitat de països amb problemes econòmics que no tenien condicions aptes per a la vacunació arribava al 30%. Fins i tot la investigació per a la creació de vacunes contra la SIDA, diabetis i malària estan sent un nucli mediàtic.

2.4. L'ARRÒS TRANSGÈNIC

L'arròs destaca sobre les altres espècies de cereals degut a la seva disposició de regenerar-se i de transformació genètica. Aquest ha presentat la capacitat de formar calls partint de diferents tipus de propàguls creant un focus d'atenció en la creació de transgènics mitjançant aquest cereal, a partir d'algunes espècies com la Taipei 309. El gran desenvolupament que provocà l'experimentació genètica amb arròs provocà el desenvolupament d'un Programa de Biotecnologia de l'Arròs, creat per la Fundació Rockefeller

2.4.1. ANATOMIA DE L'ARRÒS

➤ Grans d'arròs

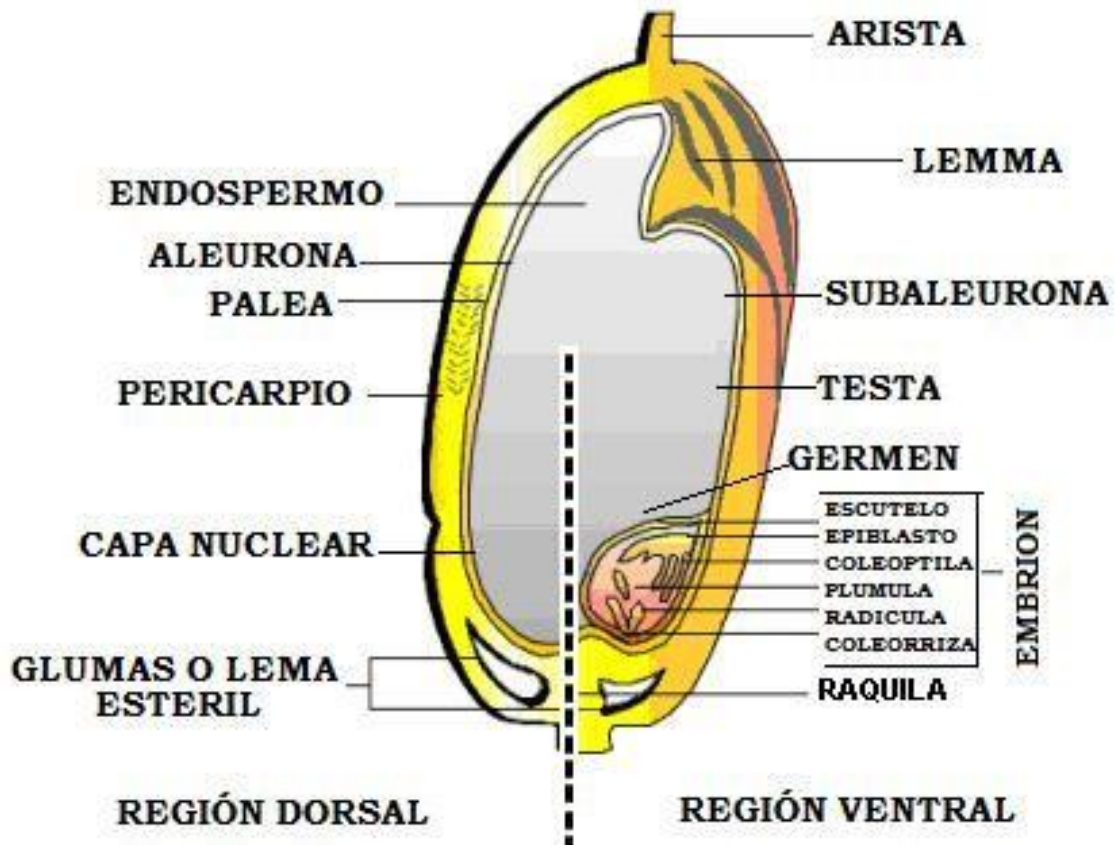
La llavor d'arròs correspon a un ovari madur i sec que està format per les següents parts:

- Closca, formada per la lemma, pàlea i les parets
- Les lemme estèrils, la raquilla, l'aresta i l'embrió situat a prop de la lemma.
- L'endosperma que aporta aliment a l'embrió durant la germinació.

El gra d'arròs sense closca continua mantenint el pericarpí, que pot ser de color blanc, marronós, vermell, lila apagat o lila intens. Sota la lemma i la pàlea es troba el pericarpí que està format per tres capes de cèl·lules fibroses molt dures (endocarpí, mesocarpí i exocarpí). Sota d'aquest s'hi troben dues capes riques en proteïna.

L'embrió està format per la plúmula, que correspon a les fulles embrionàries, i per la radícula, que és l'arrel embrionària primària. L'embrió està separat de l'endosperma per un teixit anomenat escutel.

L'endosperma està constituït per midó. A més a més conté amilosa i amilopectina.



Il·lustració 3. Anatomia de l'arròs

➤ Fulles

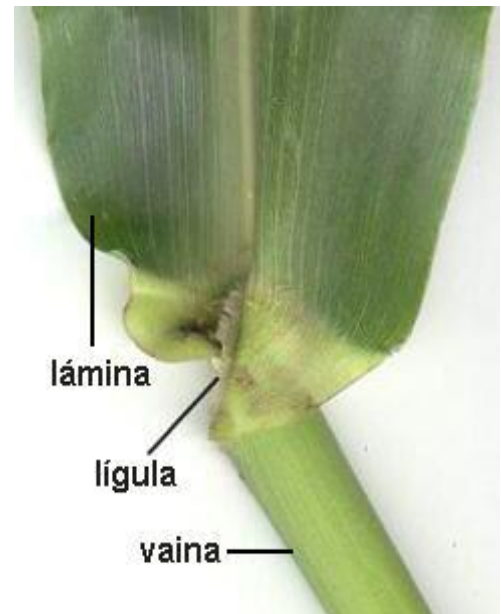
L'arròs presenta una fulla de tipus monocotiledònica, és a dir, només presenten un únic cotiledó en el seu embrió (una única fulla central)

En una fulla completa es diferencien tres parts principals: la vaina, el coll i la làmina.

La vaina o base de la fulla és la zona que surt del nus i embolica l'entre-nus. Està dividida des de la seva base per un nervi central i solcat per vasculars.

El coll és la unió entre la vaina i la làmina. Està format per la lígula que és una estructura triangular membranosa situada a l'interior del coll i continguda a la vaina; i per l'aurícula que són dos annexes del coll amb forma de falç

La làmina de la fulla és de tipus lineal de punta aguda i llarga.



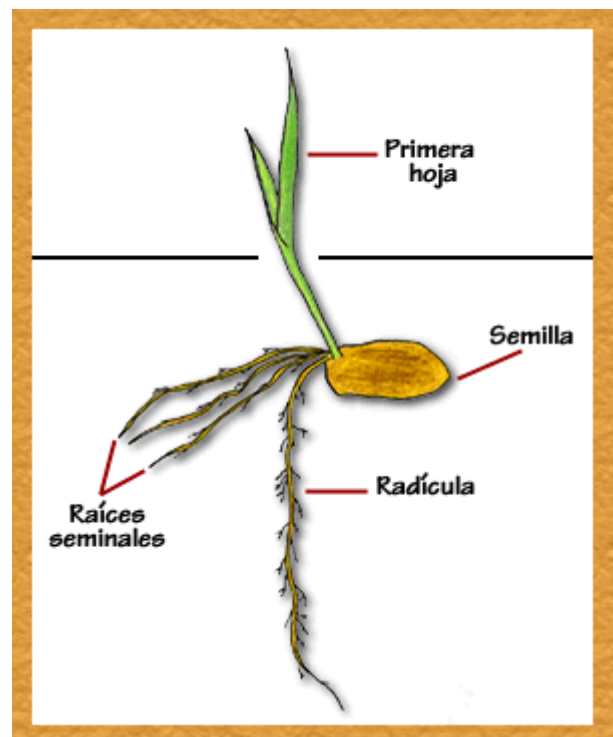
Il·lustració 4. Anatomia fulles d'arròs

➤ Arrels

Durant el desenvolupament, l'arròs produeix dos tipus d'arrels: les seminals i les adventícies.

Les seminals són poc ramificades, viuen poc temps després de la germinació i són substituïdes per les arrels adventícies.

Les arrels adventícies broten des dels nusos subterranis de la tija jove. Les arrels canvien de color segons el medi en el qual es trobin.



Il·lustració 5. Anatomia de les arrels de l'arròs

2.5. NORMATIVA EUROPEA

L'any 1996 va ser aprovat el comerç de cultius transgènics en tot el món, produint el desenvolupament de l'agricultura moderna amb ferotge velocitat. Estats Units, Amèrica Llatina i el sud-est asiàtic presenten les xifres més elevades de sembra de llavors modificades genèticament, convertint-se en pioners (Service for Acquisition of Agri-Biotech, ISAAA.). Europa en canvi, segueix a la cua d'aposta dels OMG.

L'Autoritat Europea per a la Seguretat Alimentària i Nutrició (EFSA), basa la reglamentació Europea (inclou plantes, animals i microorganismes) en les següents directives:

- **Directiva 2009/41/CE:** estableix mesures per a la utilització confinada dels OMG amb la finalitat de protegir la salut humana i del medi ambient.
- **Directiva 2001/18/CE:** regula el procediment i manipulació de plantes modificades amb finalitats experimentals.
- **Directiva 2015/412 (UE):** possibilita la restricció o prohibició dels cultius OMG en els territoris dels diferents Estats (autoregulació).
- **Reglament 1829/2003:** els aliments i pinsos modificats genèticament, han de garantir un etiquetat precís per a la seguretat de la salut humana i animal.
- **Reglament 1830/2003:** traçabilitat i etiquetat dels aliments i pinsos transgènics.

Molts països europeus han prohibit els cultius transgènics. En canvi, d'altres utilitzen l'arròs transgènic Monsanto, autoritzat el 1998 (Eslovàquia, Portugal, República Txeca, Romania i Espanya). Aquest últim és pioner, és un dels països europeus amb més flexibilitat amb la normativa dels transgènics.

3. COCCIDIOSI

La coccidiosi és una malaltia de caire parasitari, produïda per la infecció amb coccidis (protozous) de la família *Eimeria*, en el cas dels animals, i de la *Isospora* en el cas dels humans. Aquesta malaltia produeix diversos graus de enteritis en les aus. Segons la Classificació Internacional de Malalties (CIE-10) en persones es coneix comunament com a coccidiosi intestinal, produïda pel paràsit *Isospora belli* i produeix l'afectació de l'intestí prim.

Els símptomes principals de la coccidiosi són: la diarrea i diarrea sagnant. Tot i que en humans l'afectació no és greu, en animals produeix un ampli grau de mortalitat, sobretot en individus encara joves, produint grans pèrdues econòmiques en sectors ramaders .


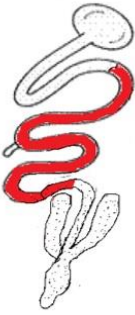


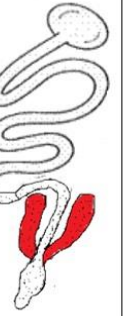
La seva transmissió es produeix a través de femta (presenta ovòcits del paràsit) i per ingestió de teixits. A causa d' això, el grau d'infecció en animals de granja o corral és molt elevat. Els paràsits de la coccidiosi són especialment infecciosos en individus immunodeficients. Això produeix que animals que pateixen situacions d'estrès o es troben malnodrits tinguin més risc d'emmalaltir. Les persones afectades amb VIH poden presentar complicacions amb el tractament d'antibiòtics.

En aus de corral la coccidiosi pot estar induïda per diferents tipus d'*Eimeria*, produint diferents efectes al llarg del seu sistema digestiu i intestinal. Alguns d'aquests són:

- *Eimeria tenella*
- *Eimeria maxima*
- *Eimeria brunetti*
- *Eimeria acervulina*

Segons l'espècie de coccidi que es manifesti en l'au produeix un cicle de vida diferent:

Tipus de Eimeria	Cicle de vida
<i>E. acervulina</i>	5 dies
<i>E. maxima</i>	7 dies
<i>E. tenella</i>	7 dies
<i>E. brunetti</i>	6 dies

Species	<i>E. Acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. Brunetti</i>	<i>E. necatrix</i>	<i>E. tenella</i>
Portion of the intestine where lesions are mostly seen					
Symptoms	Anemia, light enteritis, loss of appetite	Diarrhoea, droppings may be flaked with blood	Enteritis, occasionally bloody	Bloody enteritis, drops in feed intake	Bloody droppings, reduce in feed intake
Pathogenicity	High morbidity, low mortality		Dysentery, high morbidity, high mortality		

Il·lustració 6. Tipus d'Eimeria i zones afectades

3.1. EL PARÀSIT: EIMERIA TENELLA

L'*Eimeria tenella* és un protozou paràsit de la família *Eimeria*. Aquest es caracteritza perquè infecta la zona de l'epiteli cecal en les aus.

El seu cicle de vida és complex, la majoria del qual és intracel·lular. Presenta dues etapes:

- Una asexual -esquizogònia-
- Una sexual -gamogònia- seguida d'una altra fase asexual exògena - esporogonien l'ambient i finalitza amb la formació d'esporozous en el ooquist.

Durant el final del seu cicle, els merozoïts asexuals es diferencien en macrogametocits i microgametocits. Seguidament es produeix la reproducció sexual que forma els zigots i expulsa els occits. Els occits d'*E. tenella* s'acumulen (ooquist) i produeixen la seva maduració i expulsió amb la femta.

La infecció de les aus és directa a través dels occits esporulats que conté l'ambient, l'aigua i la femta. Aquests tanquen mitjançant una doble membrana, un contingut citoplasmàtic no diferenciats anomenat esporonte (cicle de la vida parasitari on aquest, pot infectar a un nou hoste). Quan una au ingereix el medi que conté els ovòcits esporulats aquests han de poder despendre's de la capa protectora per a infectar l'hoste. Les sals biliars contribueixen amb l'addició de tripsina i pancreatina l'entrada d'enzims els quals produeixen una alteració interna que consegüentment allibera els esporozous. Aquests són transportats per limfòcits intraepiteliais fins al cec.

3.2. AFECTACIÓ EN LES AUS

La infecció amb el paràsit *E. tenella* (una de les que produeix més mortalitat) produeix a les aus de corral la destrucció de cèl·lules epitelials intestinals en el cec degut a la seva agrupació en la mucosa intestinal durant el seu cicle de vida. Els cecs afectats amb coccidiosi es troben ensagnats i presenten coàguls de sang i deshidratació de les vísceres. En l'últim estat del cicle, aquest es caracteritza per trobar-se engrossit i conté exsudat fibrinós, que prolifera a la possibilitat d'un nou brot de coccidiosi. La mucosa es troba amb múltiples hemorràgies i el contingut intestinal mesclat amb sang fresca o coagulada.

Les aus de corral (ex. *Gallus domesticus*) que es troben afectades amb *Eimeria Tenella* presenten els següents símptomes:

- Sagnat en la femta
- Caiguda del plomatge
- Baixada del pes
- Mort

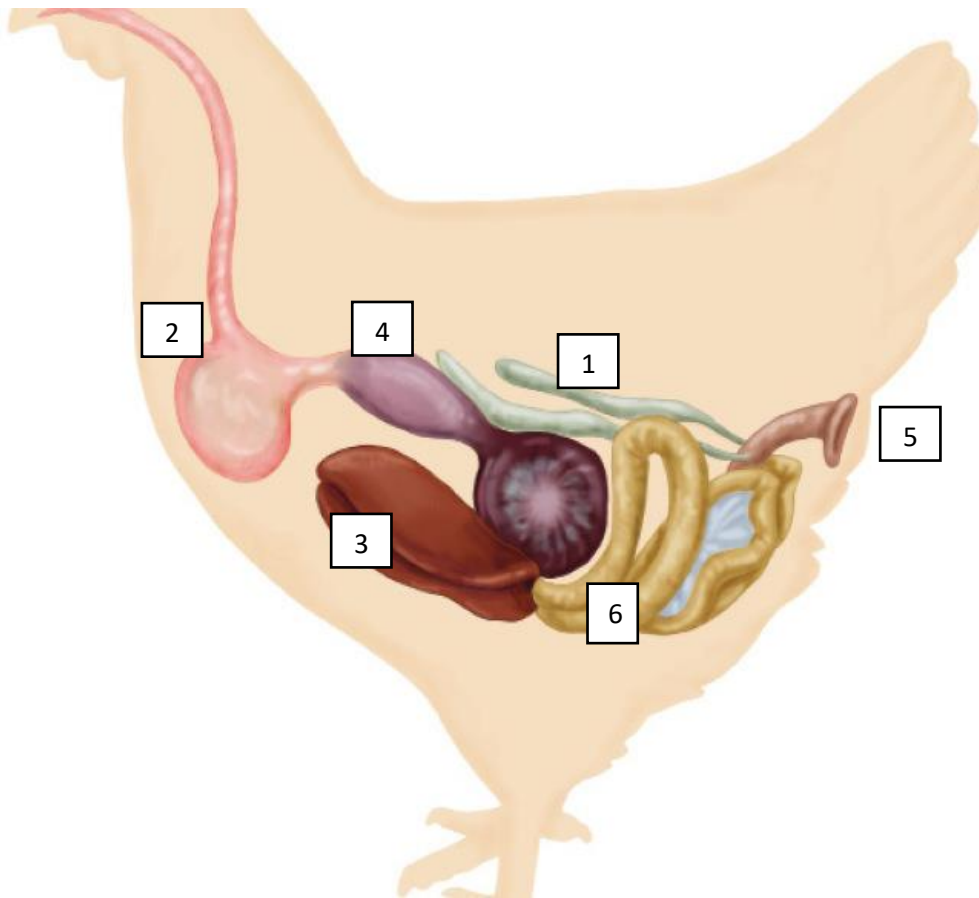
A més a més de les conseqüències que produeix la coccidiosi en les aus, la seva mortalitat suposa grans pèrdues econòmiques a l'any per infecció de coccidiosi. Cal recordar que l'*Eimeria tenella* és un dels paràsits de la família *Eimeria* que causa més brots i recaigudes.

El diagnòstic en aus vives no és clar. Es realitza la inspecció en els intestins de les aus sacrificades per tal de poder detectar-ho.



Il·lustració 7. Lesions produïdes per l'*E. tenella*

3.2.1. SISTEMA DIGESTIU DE LES AUS DE CORRAL



1	CECS
2	PAP
3	PEDRER
4	ESTÓMAC
5	CLOACA
6	INESTINS

3.3. TRACTAMENT DE LA MALALTIA

La coccidiosi es controla amb productes químics anomenats coccidiostàtics que s'afegeixen al pinso. La seva utilització ha causat l'aparició de paràsits *d'Eimeria* resistents als coccidiòcits (Ola-Fadunsin and Ademola, 2013). Les coccídies són productes químics que disminueixen la càrrega de coccidis en el medi i els coccidiostàtics impedeixen que creixi la càrrega de coccidis en el medi, detenen així el seu cicle de vida sense matar-los.

L'any 1999 s'examinà la sensibilitat d'aïllament d'alguns tipus *d'Eimeria*, descobrint que l'eficàcia dels medicaments utilitzats fins aquells temps tenien una eficàcia marginal. A Europa el 15 de maig del 2002 es va prohibir l'ús d'un gran nombre d'anticoccidians químics, obligant a crear noves estratègies.

Actualment s'utilitzen a més dels productes permesos anticoccidians, les sulfonamides: sulfadimetoxina, sulaquinoxalina, sulfametazina. Aquestes no poden ser utilitzades en gallines ponedores. L'adició de vitamines A i K promou la recuperació de les aus.

Tot i els mètodes que s'utilitzen, encara no s'ha trobat un fàrmac que suposi una efectivitat del 100%, per tant, segueixen les contínues investigacions sobre aquesta malaltia.

3.3.1. VACUNES PER A LA COCCIDIOSI

La immunització contra la coccidiosi amb vacunes comercials és molt utilitzada. Si les aus de corral estan exposades a l'efecte natural d'un nombre moderat d'occits en l'ambient podria produir el desenvolupament de la immunitat a les espècies parasitàries.

Actualment es troben dos tipus de vacunes:

- Vacunes virulentes: contenen ooquistes esporulats vius patogènics de diverses espècies *d'Eimeria*.
- Vacunes atenuades: contenen ooquistes esporulats vius de línies atenuades de diverses espècies.

Tot i això, aquestes vacunes han demostrat presentar una efectivitat limitada i consegüentment efectes no desitjables en les aus pel dany a l'epiteli intestinal, donant com a conseqüència la no uniformitat del retard del creixement i en condicions idònies de temperatura i humitat, el risc de presentar un brot de la malaltia. Per la qual cosa, d'aquesta malaltia segueix depenent l'ús rutinari de fàrmacs anticoccidians (Lyllehoj, 2006)

4. INTRODUCCIÓ DEL GEN EtMIC A L'INTERIOR DE LA PLANTA D'ARRÒS (TRANSFORMACIÓ DE L'ARRÒS)

4.1. PROCÉS DE PREPARACIÓ DELS EMBRIONS

4.1.1. CULTIU IN VITRO DE L'ARRÒS

Quan es parla de conreu de teixits vegetals es refereix al cultiu in vitro de plantes, llavors, parts de la planta (teixit, òrgans, embrions, cèl·lules, protoplasts) en un medi amb condicions asèptiques. Normalment, en el cultiu de plantes s'utilitzen els seus propàguls (embrions) per a iniciar el creixement en el medi in vitro. En l'arròs, la utilització de llavors madures per a la seva transformació produeix un increment en l'èxit del procés. Les llavors madures proporcionen la fàcil extracció dels embrions. Hanning, 1904, fou el primer en intentar fer créixer embrions en un cultiu in vitro. L'any 1924 Dietrich feu créixer in vitro diferents tipus de plantes. Establí que aquelles que poden créixer in vitro des de llavors madures no presenten cap problema, però els embrions extrets de llavors immadures produïen la mort de la planta (Dietrich, 1924).

La transformació embriogènica en cultius in vitro en medis òptims per al teixit pot produir la proliferació de calls. Els calls són masses indiferenciades de cèl·lules que poden haver introduït el gen o no, consegüentment s'elabora la selecció d'aquests. En l'arròs s'utilitza la embriogènesi somàtica. Aquesta es caracteritza pel desenvolupament d'embrions que no contenen cèl·lules de la fecundació sinó una estructura bipolar formada mitjançant cèl·lules somàtiques. Els medis estan formats habitualment per: sals mineres, sucres (com a font de carboni), hormones i vitamines (medi MS desenvolupat per Murashige i Skoog, 1962). Els tractaments hormonals que proporcionen els diferents medis als embrions en la regeneració i selecció produeixen l'aparició de més o menys cèl·lules transformades. Aquests calls poden portar a la producció dels anomenats "shoots" o brot que consegüentment produirà l'aparició d'arrels, o bé, si aquestes cèl·lules no s'adeqüen al medi poden produir a la seva ruptura. L'embriogènesi és consegüentment un procés molt delicat.

4.1.1.1. PREPARACIÓ DE LES LLAVORS D'ARRÒS

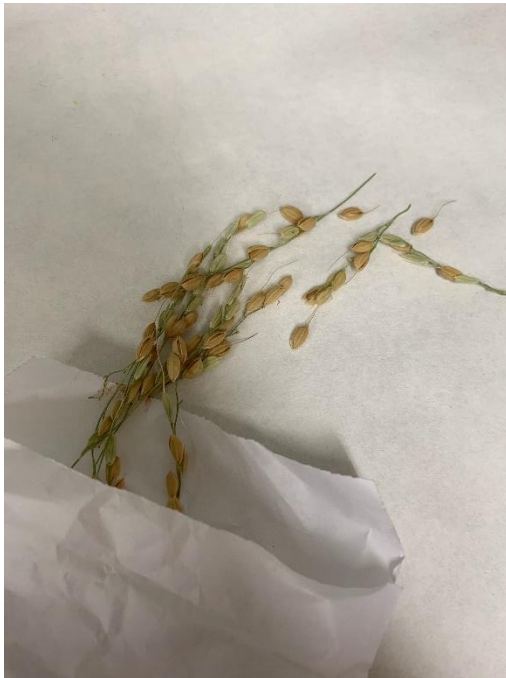
RENTAT DELS GRANS D'ARRÒS

Es recullen els grans d'arròs madurs de la planta i s'embossen per assecar-los. Mitjançant un procés automatitzat es desprèn la pellofa i s'obté el gra blanc (part proteica i embrió).

S'agafen els grans blancs i es col·loquen en un tub de falcon de 50ml. Per a la esterilització de les llavors:

- S'introdueix al tub de falcon etanol durant 2min en agitació
- Es renta tres cops amb aigua esterilitzada
- S'afegeix hipoclorit de sodi durant 20min
- Es renta tres cops amb aigua esterilitzada
- Es col·loquen les llavors en paper blotting estèril

S'agafen les llavors i es passen a medi amb MSP (medi de proliferació), 20 llavors per placa.



Il·lustració 8. Llavors d'arròs seques



Il·lustració 9.. Mètode automàtic d'obtenció dels grans blancs

4.1.1.2. INICI DE L'ETAPA FOSCA:

El cultiu in vitro en foscor es produeix en les primeres etapes de regeneració de l'embrió transformat. Aquest mètode s'utilitza per a la proliferació de cèl·lules transformades sense expressió dels cloroplasts (en contacte amb la llum, tota la mostra de teixit obtingut es tenyiria degut a la clorofil·la). Permet la selecció de complexos transformats ja que els medis contenen els antibiòtics als quals el plasmidi introduït és resistent.

4.1.1.2.1. MSP (PROLIFERATION MEDIUM)

Temps en el medi: 5 dies

Les llavors rentades (sense pellofa) es col·loquen submergint parcialment el gra. Aquest medi produeix, com el seu nom indica la proliferació de l'embrió, és a dir, l'augment de la mida d'aquest. L'embrió en el seu estat anterior no mesurava més d'1mm, per la qual cosa l'embrió per poder ser extret s'ha de col·locar en un medi òptim per al seu desenvolupament. Aquests presenten més resultats en medis amb nivells alts de sacarosa, a més a més de la substància base MS.

Després de 5 dies en proliferació es podrà observar l'escutel, la qual cosa significa que els embrions ja poden ser separats de l'endosperma (part proteica del gra d'arròs).

- Extracció dels embrions

En una làmpada de flux laminar i amb sistemes de esterilització es col·loca la placa de petri amb les llavors sota el microscopi òptic.

Mitjançant dues pinces es pren la llavor i amb suavitat es retira l'escutel. Seguidament es pressiona lleugerament al mig del gra d'arròs. A mesura que es fa pressió s'observarà la proliferació de l'embrió. Finalment, quan s'hagin extret cadascun dels embrions aquests es traspassen a un nou medi de MSP fins al dia del bombardeig.



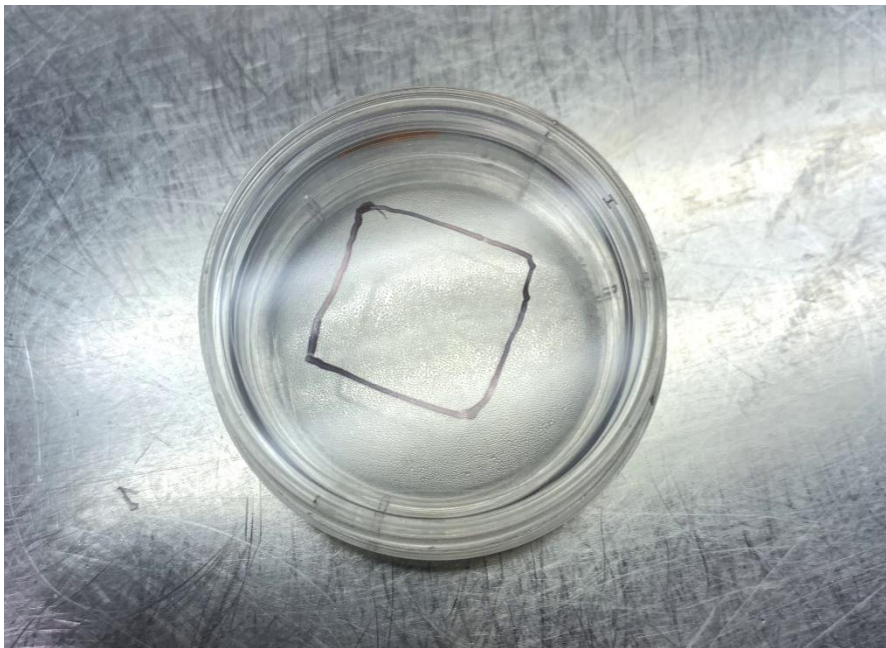
Il·lustració 10. Extracció d'embrions

4.1.1.2.2. MSO (OSMOTICUM)

Temps en el medi: o/n

El dia que es produeix el bombardeig, les plaques de MSP no són òptimes per al correcte desenvolupament de la tècnica, consegüentment els embrions es traspassen a una placa d'osmoticum. Aquesta no inclou cap tipus d'hormona de creixement, és a dir, el medi només inclou la substància base MS. El traspàs dels embrions es produeix 4h abans de l'inici del bombardeig, perquè l'embrió pugui adaptar-se al nou medi. La placa d'osmoticum presenta una franja delimitada corresponent a la secció que la pistola gènica pot transformar. Els embrions són orientats en posició lineal, un al costat de l'altre.

En el bombardeig, es deixen 4h de marge entre el primer dispar i el segon. Els embrions bombardejats es deixen en el medi d'osmoticum tota la nit.



Il·lustració 11. Placa d'osmoticum

4.2. PREPARACIÓ DE LA GOLD PREPARATION

4.2.1. AMPLIFICACIÓ DEL GEN PER PCR

L'interès pel genoma dels organismes i la seva investigació ve dels anys 70 amb el desenvolupament de la tecnologia recombinant de l'ADN. Aquesta tècnica permet la replicació in vitro mitjançant un bacteri o plasmidi. Però, el següent esglaó en la clonació del DNA fou descobert per Kary Mullis (1985), qui posteriorment rebé el Premi Nobel de química, inventor de la reacció en cadena de la polimerasa, o més coneguda com a PCR per les seves sigles en anglès.

En una replicació in vitro en cèl·lules procariotes hi ha presents dues etapes:

- **FASE D'INICI**

El DNA es desnatura (perd la seva estructura secundària de doble hèlix, degut al trencament dels enllaços de pont d'hidrogen produïts per l'enzim helicasa).

Les topoisomerases trenquen les tensions causades pels superenrotllaments. Es crea la forqueta de replicació (proteïnes estabilitzadores).

- **FASE D'ELONGACIÓ**

Procés bidireccional, és a dir, es treballa en ambdós sentits formant-se bombolles de replicació.

L'RNA polimerasa (primasa) sintetitza un primer (fragment curt que actua com a encebador) i la DNA-polimerasa comença la síntesi del filament patró.

En el filament contrari es formen els fragments d'okazaki.

La DNA-polimerasa I actua com a exonucleasa retirant els segments d'RNA i omplint els buits amb DNA.

La DNA-ligasa uneix els segments i es finalitza el procés amb la duplicació total del DNA.

La PCR (Polymerase chain Reaction) és una tècnica in vitro que es duu a terme per produir una amplificació d'una regió d'ADN amb una seqüència de nucleòtids coneguda. Aquesta reacció es basa en la replicació del DNA produït per les DNA polimerases en cèl·lules eucariotes i procariotes. Una DNA polimerasa és un enzim que catalitza DNA in vitro. Per a produir la síntesi aquest enzim necessita de la presència de desoxiribonucleòtids-5-trifosfats, ions de magnesi, un fragment de DNA amb filaments patró i a l'altre extrem un d'encebador. El centre actiu de la polimerasa (loci) queda ocupat pel DNA patró, el DNA encebador i el següent nucleòtid. La DNA-polimerasa funciona amb un únic sentit 5' → 3', sintetitzant un filament complementari i

antiparal·lel al filament patró. Aquesta tècnica no requereix d'un plasmidi o bactèria per a la clonació del genoma, si mes no, continua amb la necessitat de dues regions conegudes adherides als extrems de la cadena, en aquest cas de dos encebadors que delimitaran l'ADN que es clonarà.

La PCR consta de: encebadors oligonucleòtids (primers) que són complementaris a cadascun dels dos brins de l'ADN (forward i reverse) i reconeguts per la polimerasa permetent l'inici de la reacció, aquests consten d'uns 18-20 nucleòtids. Els encebadors determinen els límits del producte resultant.; una DNA- polimerasa (DreamTaq Polimerasa) que catalitza la reacció, dNTPs (nucleòtids que la polimerasa utilitzarà per teixir la cadena complementària) i un Buffer que està constituït per Mg_2Cl i ATP (medi impulsor de la polimerasa).

En aquest cas es necessita produir la clonació d'un PCR ja que el segment de DNA resultant es vol introduir en un plasmidi. El DNA ampliat seria suficient, però aquests fragments no contenen les condicions òptimes per a poder ser introduïdes en el vector de clonació. L'estratègia que s'usa per a la clonació dels productes de la PCR:

- t/a clonació: la Dream Taq- Polimerasa afegeix a l'extrem 3' una Adenina extra al final de la cadena de DNA, ja que el vector on es vol introduir el gen presenta una seqüència de timines complementàries a aquest fragment. Tot i ser una de les tècniques més usades en clonació de PCR la seva eficiència és destacable degut a la introducció directa al plasmidi d'interès.

CICLES	NOMBRE DE CÒPIES
1	2
4	16
10	1024
20	1.048.576
30	1.073.741.824

La PCR es duu a terme en una màquina anomenada termociclador, aquesta és capaç de canviar ràpidament la temperatura en els tubs de la mostra per a proporcionar les condicions òptimes de la reacció. Normalment els termocicladors utilitzen el principi de calor/fred anomenat efecte Pelletier, que es basa en l'intercanvi de calor produït per dues superfícies connectades a la corrent. L' exactitud de la temperatura és el

paràmetre principal que controla un termociclador. L'escalfament inicial de les mostres és un mètode que utilitzen alguns termocicladors per a l'increment de l'especificitat dels encebadors (primers) durant la primera síntesi de DNA. En la dream Taq Polimerasa aquesta es manté inactiva a temperatures òptimes inferiors als 55°C per a evitar l'expansió d'encebadors no coincidents.

Procediment:

- **DESNATURALITZACIÓ DEL DNA:**

El DNA presenta una doble cadena d'hèlix (estructura secundària) per tal de poder-la separar; perquè la polimerasa comenci la seva actuació es desnatura (separació de la doble cadena pel trencament dels ponts d'hidrogen que la unien) aplicant-li una temperatura de 95°C (30")

- **UNIÓ A L' ENCEBADOR**

Forwards and reverse.

La reacció es refreda per tal de produir aquesta unió. El DNA presenta una seqüència inicial i final reconeguda per aquests encebadors. Gràcies a la unió d'aquests la Polimerasa pot actuar amb molta més rapidesa.

- **ELONGCIÓ DE LA CADENA**

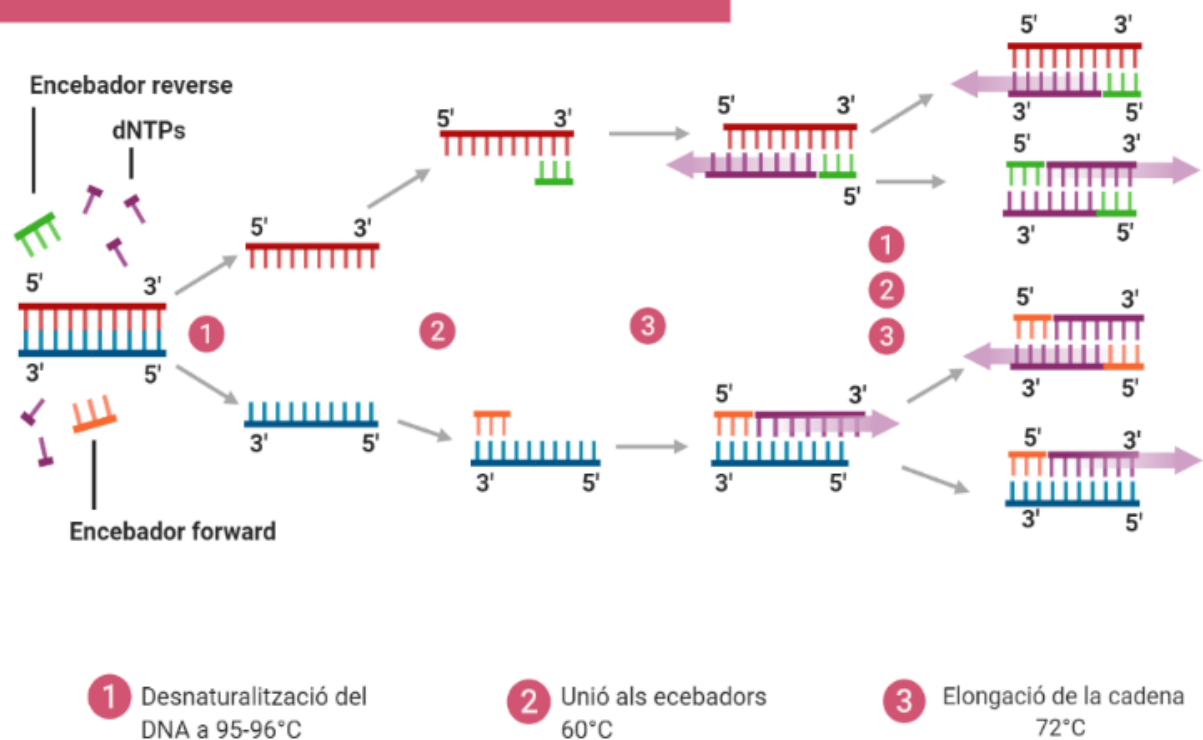
DREAMtaq Polimerasa actua a la temperatura de 72°C unint els dNTPs presents en el medi amb cadascuna de les bases complementàries del fragment patró. El buffer que s'utilitza conté ATP i Mg_2Cl que serveixen com a percussors de la polimerasa.

SABER MÉS

L'ATP és un nucleòtid de gran importància metabòlica ja que actua com a molècula energètica. Gràcies als seus dos enllaços esterfosfòrics es capaç d'emmagatzemar 7,3kcal/mol per cada enllaç. Quan s'hidrolitza allibera aquesta energia passant a ADP+Pi (àcid fosfòric). L'ADP també es pot hidrolitzar alliberant totalment l'energia emmagatzemada produint AMP + Pi.

- **CONSERVACIÓ** a 8°C en cas de no utilitzar-se directament per a la electroforesi.

Reacció en cadena de la polimerasa - PCR



Il·lustració 12. Esquema de funcionament d'una PCR

4.2.1.1. MATERIALS I MÈTODES

➤ PROTOCOL DE PREPARACIÓ MOSTRES PCR

Tenim disponibles 11 mostres del DNA EtMIC, per tal de dur a terme les mesures més adients se sumen dues mostres més per assegurar l'exactitud de la preparació del MM i per tal de poder tenir, en cas d'equivocació, dissolució de reserva.

Els materials que es necessitaran són:

- Tubs Eppendorf
- Micro pipeta : 0-10, 0-50, 0-1000
- Condicions esterilitzades (rentat de la taula de treball amb alcohol 80% i manipulació de reactius i materials amb guants)

Taula 1. Materials i quantitats per realitzar mostres per a PCR

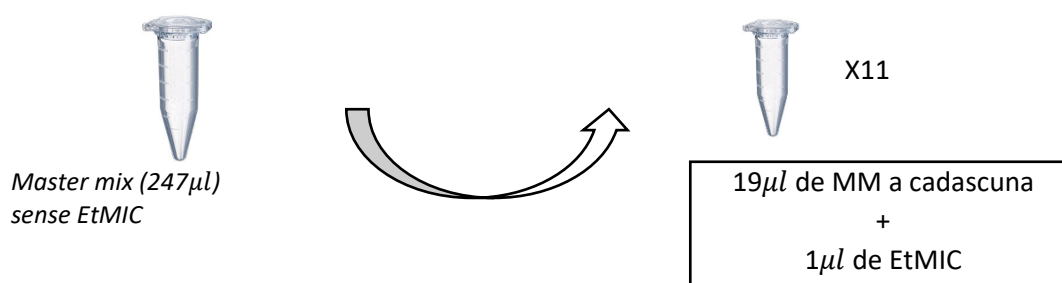
Master Mix (MM)	Buffer 10x		2μl	X13 (mostres)	26μl
	dNTPs		0,4μl		5,2μl
	Primers (encebadors)	Forward	0,4μl		5,2μl
		Reverse	0,4μl		5,2μl
	DreamTaq Polimerasa		0,1μl		1,3μl
	H ₂ O		fins a 20μl (15,7μl)		204,1μl
DNA (EtMIC)			1μl	13μl	
TOTAL			20μl	260μl	

➤ PREPARACIÓ I REPARTICIÓ DEL M.M EN LES MOSTRES

1. Amb una micro-pipeta de 0-10 μ l es posen els reactius amb menys volum, començant per la Polimerasa seguint amb els dNTPs i els primers.
2. Es regula la micro-pipeta 0-50 μ l a 26 μ l i se solta suaument el buffer.
3. Finalment amb la micro-pipeta 0-1000 μ l s'introdueix l'aigua a la Master Mix mesclant amb suavitat i utilitzant la pròpia pipeta.

RECORDA: Per tal de no contaminar la resta de components de la Master Mix al voler pipetejar es obligatori canviar de punta cada vegada que s'agafi un nou reactiu.

4. Per tal de repartir la mescla en els 11 tubs de Eppendorf es pipeteja 1 μ l del DNA EtMIC (es troba a temperatura de 4°C), canviant de punta a cada succió, i seguidament 19 μ l de la Master Mix amb canvi de punta a cada Eppendorf.
5. Es mescla amb precaució la dissolució (si és necessari amb el vòrtex lleugerament)



RECORDA: Es recomana tenir les mostres per la PCR en gel per seguidament ser transferides a la maquina.

➤ PROGRAMA DEL PCR

Taula 2. Protocol de PCR en Termociclador en 30 cicles i interpretació

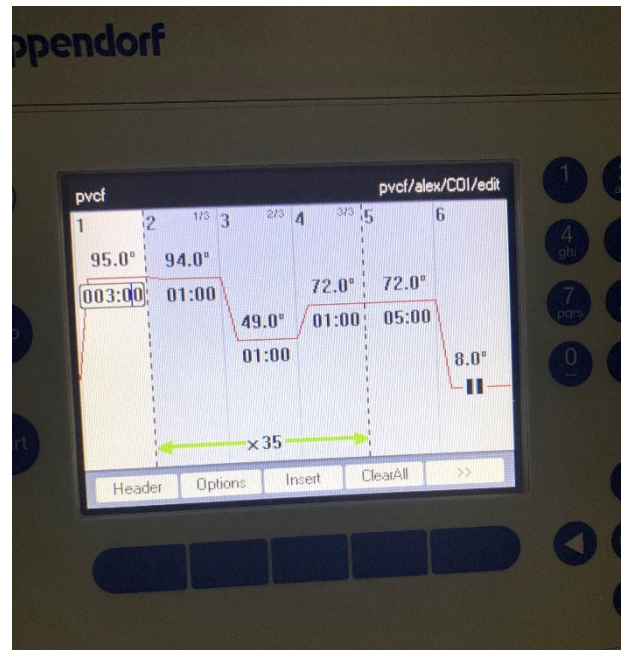
PASOS	TEMPERATURA	TEMPS
Desnaturalització	95°C	30"
30 cicles	95 °C	30"
	60 °C	30"
	72 °C	45"
Extensió final	72 °C	5'
Conservació	8 °C	

- Estirament de la cadena **95 °C**
- Unió als encebadors **60 °C**
- Actuació de la polimerasa **72 °C**

30 cicles

- La polimerasa actua rectificant les cadenes complementàries en cas d'equivocació **72 °C**

Extensió final



Il·lustració 13. Termociclador, programa de la PCR

➤ ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

És el mètode estàndard per a la separació, identificació o purificació de fragments de DNA o RNA segons un rang de mides equivalents al seu pes molecular i càrrega (des de 1000 a 20 kb). La tècnica és capaç de determinar la localització del DNA utilitzant en concentracions baixes bromur d'etidi (és un conegut mutagen) que es lliga a l'ADN provocant en llum ultraviolada la fluorescència de les mostres per tal de poder extrapolar les dades. Ja que el bromur d'etidi no produeix coloració i a llum visible és transparent, l'ADN seria difícil de ser afegit a cadascun dels pous. Les mostres són tenyides amb els anomenats tampons de càrrega o tracking dyes. Aquests són de càrrega negativa i aporten pes molecular al DNA perquè inclouen glicogen, produint que a mesura que "cor el gel" es pugui identificar el seguiment de la mostra i finalment que es pugui localitzar sense dificultat la banda ja que produeix la seva fixació. La mescla de glicogen i un tampó de càrrega (en aquest cas es parla de xylene cyanol FF = coloració verda) es troben presents en el Buffer 10X que s'ha inclòs en la preparació de mostres amb anterioritat (*Taula 1. Materials i quantitats per realitzar mostres per a PCR*). També en el primer pou s'hi afegeixen els anomenats marcadors de DNA que són una guia de pes. Cadascuna de les bandes que produeix indiquen un pes molecular en parell de bases (bp) específic, l'EtMIC té un pes molecular de 600-750bp, per tant s'utilitzarà un marcador que produeixi bandes a aquesta alçada (Molecular Marker I). D'aquesta manera es pot observar si les mostres contenen o no el gen. Les bandes de DNA de les mostres, en cas de resultat favorable, poden ser recuperades del gel per a la clonació de la mostra.

L'agarosa és un polímer lineal que solidifica en forma de gel presentant a nivell molecular una estructura en forma de matriu d'agarosa unida amb ponts d'hidrogen i formant porus. Aquest es troba en estat sòlid i s'escalfa juntament amb TBE 1x produint una reacció amortidora. També s'inclou el bromur d'etidi i són abocats sobre el motlle deixant endurir el gel. Damunt s'hi aplica el buffer TBE 1x que transmet el corrent elèctric al ser una dilució salina, que aplicat sobre el gel de manera que quedin enfonsats els pous i es retira amb suavitat el motlle. Les mostres de DNA es tenyeixen amb Xylene cyanol FF. Quan un camp elèctric és aplicat al gel, el DNA que presenta una càrrega negativa en un pH neutre migra al positiu. La migració del DNA depèn del pes molecular d'aquest, la concentració d'agarosa i la composició del buffer aplicat sobre el gel. Les molècules que presenten unes dimensions majors són d'un procés més lent de migració, en canvi les molècules que presenten menor grandària migren ràpidament entre els porus del gel.

▪ **PREPARACIÓ DE GEL D'AGAROSA PER A ELECTROFORESI:**

TBE 1x (solució salina)	100ml
Agarosa	1g
BrEt (Bromur d'etidi)	1 μ l

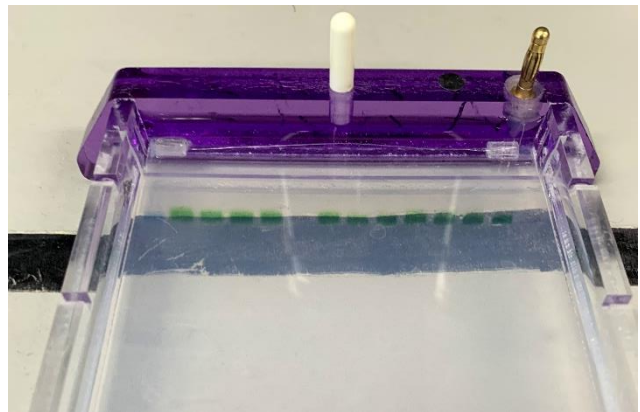
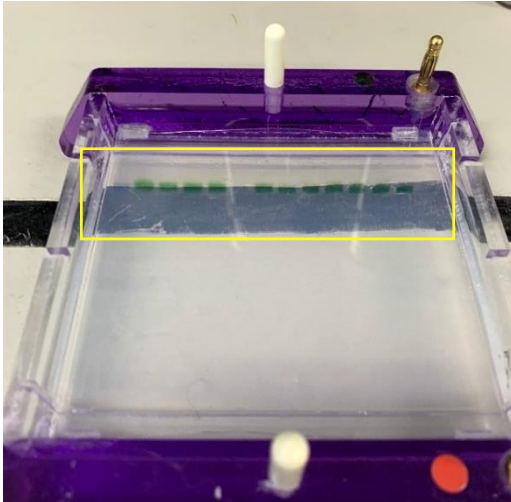
- En un erlenmeyer de 200ml aboquem del recipient que conté la mescla ja preparada de TBE 1X 100 ml.
- Es pesa en una bàscula de precisió 1g d'agarosa en pols.
- Finalment, amb precaució i amb la utilització d'una micropipeta especial preparada en les zones amb perillositat, s'extreu 1 μ l de BrEt.
- Per concloure la mescla de l'erlenmeyer, es posa a escalfar uns segons per tal de poder desfer l'agarosa.

PREPARACIÓ DE L'ELECTROFORESI

- a) Es col·loca el motlle de pous necessaris i parets segons les mostres obtingudes.
- b) Amb precaució i amb una micropipeta, primerament se segella el motlle amb la mescla d'agarosa preparada amb anterioritat, per assegurar-ne la seva fixació.
- c) Seguidament s'aboca tot el contingut fins que sobrepassi el pinte (motlle dels pous)
- d) Es deixa refredar fins a la solidificació del gel.
- e) Finalment s'afegeix TBE 1X fins que se sobrepassi els motlles, també s'afegeix als recipients.
- f) Es retiren els motlles amb precaució per no perjudicar el gel.

CÀRREGA DE MOSTRES ALS POUS

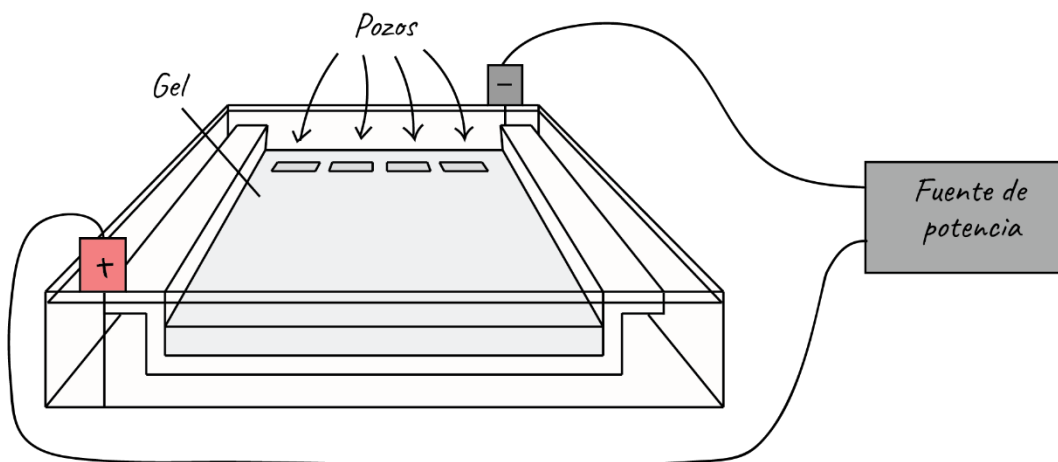
S'extreu 11 μ l de cadascuna de les mostres amb la micropipeta i suaument s'introdueix la punta. Lentament es descarrega la mostra mentre s'apuja la micropipeta per així ocupar tot l'espai del pou. A cada mostra s'hi fa el canvi de punta per a no contaminar les mostres.



Il·lustració 14. Càrrega de mostres als pous

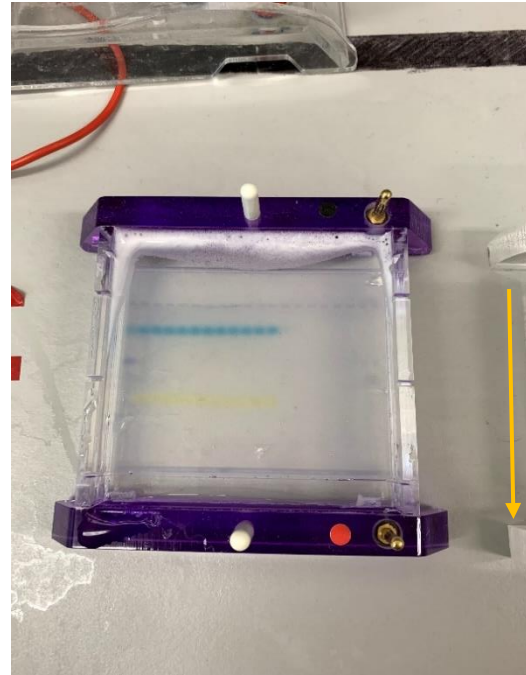
CÓRRER EL GEL

El gel, amb les mostres introduïdes a cadascun dels pous indicats, es col·loca en una càmera amb dos extrems dels quals un es connecta a l'electrode positiu (extrem del gel sense els pous) i l'altre al negatiu (extrem del gel amb els pous). La solució salina amb la qual s'emplena el gel cobrint els pous produirà que es pugui transmetre el corrent, d'aquesta manera el DNA podrà desplaçar-se.



Il·lustració 15. Esquema de funcionament de la corrent en l'electroforesi

Quan s'aplica el corrent al gel, aquest fa que els grups fosfat de l'esquelet de sucres-fosfat atorguin una càrrega negativa a les molècules de DNA, amb la qual cosa aquestes comencen a moure's entre els porus del gel cap al pol positiu. A mesura que corre el gel, els fragments més curts viatgen a més velocitat que els fragments més grans. Finalment, els fragments més curts estaran propers al pol positiu mentre que els fragments més grans estaran propers als pous de sortida. Una banda de DNA definida conté un gran nombre de fragments de DNA de la mateixa mida.



Il·lustració 16. Córrer el gel

VISUALITZACIÓ DEL GEL

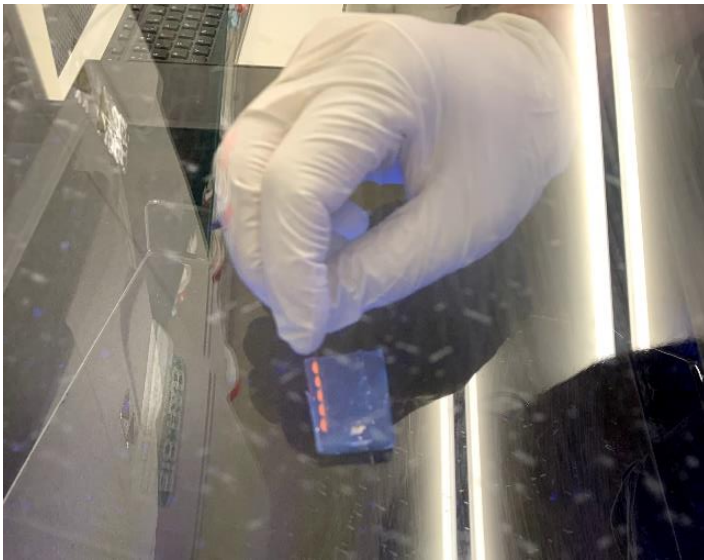
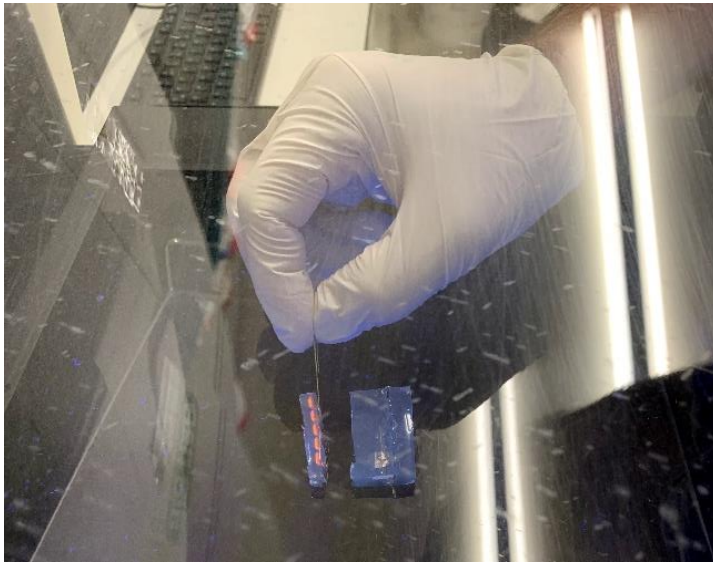
Una vegada ha finalitzat el temps que el gel corre, aquest s'extreu de la càmera i s'examina en una làmpada ultraviolada. Degut a la presència de bromur d'etidi produeix la fluorescència de les mostres, podent determinar el seu pes molecular segons la banda obtinguda. La imatge és obtinguda mitjançant una càmera digital a l'interior de la làmpada.



Il·lustració 17. Visualització del gel

➤ **TALLAR I PURIFICAR LA BANDA**

S'utilitza el kit d'extracció de gel QIAquick. Aquesta tècnica permet la recuperació del DNA d'un gel d'agarosa. Per tal de poder-la realitzar, es va seguir el [1]**Protocol de tallar i purificar la banda d'un gel d'agarosa**



Il·lustració 18. Purificació de bandes de DNA en gel d'agarosa. El bromur d'etidi produeix la fluorescència de les mostres en la làmpada ultraviolada.

4.2.2. SELECCIÓ DEL PLASMIDI

➤ Els vectors

Fins a la dècada de 1970, l'anàlisi del DNA era molt difícil ja que les cadenes eren massa llargues. Amb el descobriment dels enzims de restricció, es van poder separar molècules de DNA en grans fragments per a facilitar el seu estudi. Gràcies a l'especificitat de reconeixement de seqüències que poden ser tallades per aquests enzims ha estat possible la clonació de fragments de DNA de diferents organismes per a produir DNA recombinant.

Els enzims de restricció són molècules capaces de reconèixer seqüències específiques de nucleòtids en una cadena de DNA o RNA i tallar aquests punts anomenats dianes de restricció.

La clonació de DNA és el procés d'introducció de fragments de DNA (inserts) en una molècula de DNA anomenada vector, el qual pot replicar-se o no de manera autònoma en l'organisme hoste. Els vectors de clonació es defineixen com a molècules de DNA de doble cadena, que tenen capacitat d'introduir un fragment de DNA exogen. Aquests es poden classificar en:

- **Vectors de clonació:** els vectors són de clonació quan el seu propòsit és el d'obtenció de grans quantitats de molècules recombinant o bé emmagatzemar el DNA inserit. Són d'aquests tipus els plasmidis, bacteriòfags, fagèmids, còsmids i cromosomes artificials bacterians.
- **Vectors d'expressió:** Els vectors són d'expressió quan el seu propòsit és la transcripció (produir RNA) o bé produir la proteïna d'aquest transcrit. Són d'aquest tipus els plasmidis i bacteriòfags.

Per a poder insertar un fragment de DNA en un vector són necessaris els enzims de restricció i l'enzim Fosfata Alcalina. Els enzims de restricció es mesclen amb fragments de DNA produïts pel mateix enzim. Posteriorment, l'addició de l'enzim Fosfatasa Alcalina evita la circularització del vector afegint un extrem 3' fosfat evitant la unió dels dos extrems. L'addició del DNA insert amb complementarietat amb un dels extrems del vector produeix la unió a l'insert i recircularització d'aquest quan s'afegeix la ligasa. Els vectors estan formats per diversos elements:

- **Origen de replicació:** seqüència de DNA del vector que és reconeguda per les proteïnes que identifiquen la zona d'inici de replicació (ORI). Els plasmidis es

caracteritzen per presentar només una zona ORI i produir la replicació en una única direcció.

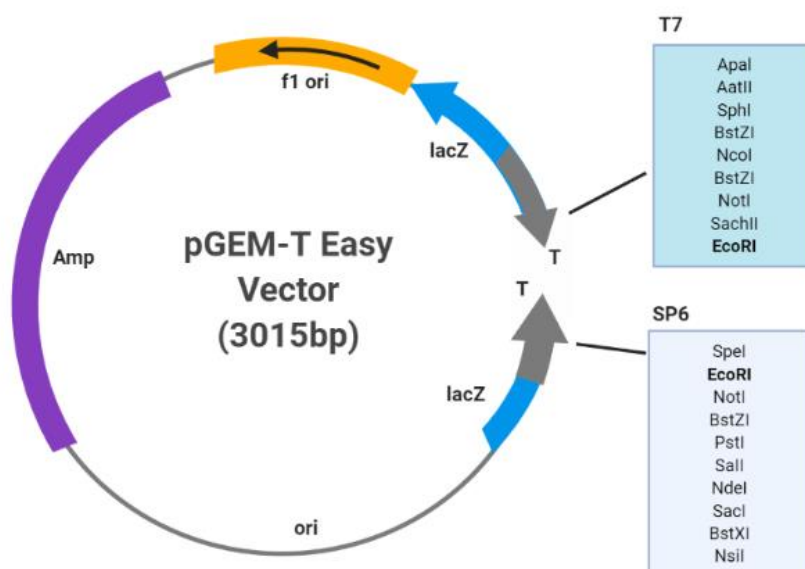
- Marcador de selecció: aquest és un gen que usualment presenta resistència a antibiòtics o bé genera un fenotip amb el qual es podrà seleccionar la cèl·lula que incorpora el vector. Alguns vectors poden presentar dos marcadors.
- Zona de clonació múltiple: són fragments de DNA específics reconeguts per les enzims de restricció. Aquestes zones es troben molt juntes, i presenten una àmplia gamma de possibilitats d'inserir qualsevol tipus de fragment.

➤ Plasmidis:

Són molècules circulars de DNA que són independents del cromosoma bacterià. Aquestes constitueixen el material genètic mòbil bacterià, funcionant com a mitjà de transport de gens entre bactèries (la majoria d'aquests gens tenen resistència a antibiòtics). Els plasmidis són considerats vectors de clonació que són manipulats per a poder introduir inserts en bactèries per a l'augment de molècules recombinant.

Aquests són molt petits, formats entre 2 a 5 kb de DNA, facilitant l'anàlisi del DNA inserit al seu interior.

➤ pGEM T-Easy



Il·lustració 19. Vector pGEM- Teasy

Els vectors (plasmid) són comercials o es poden crear; en aquest cas, es va utilitzar el plasmidi pGEM- TEasy com a vector de clonació de l' insert EtMIC.. Aquest vector té com a característiques:

- **Marcadors de selecció:** presenten resistència a l'ampicil·lina (antibiòtic) i en la zona on el nostre gen s'insereix presenta l'enzim lacZ. Aquest té com a característica l'expressió del color blau en colònies que introdueixen el vector. Entre el lacZ hi ha situades dues timines (cues del vector), el nostre gen presenta complementarietat a aquestes cues (en el PCR se li ha afegit una cua d'adenines). Conseqüentment la unió de l'insert al vector produeix la no expressió del lacZ (el fragment de DNA inserit produeix el trencament del fenotip)
- **Origen de replicació:** aquest enzim presenta un ORI
- **Zona de clonació múltiple:** en aquesta zona el vector presenta diverses possibilitats d'enzims de restricció que reconeixen les seqüències (T7 i SP6), però en aquest cas, s'utilitzaran els enzims de restricció EcoRI en ambdós zones.

4.2.3. LLIGACIÓ DEL GEN AL VECTOR

Per tal de produir la reacció de lligació amb el plasmidi (introducció del gen al vector) es necessita el gen, el vector i la lligasa.

La lligasa és un enzim que catalitza la unió de molècules amb l'energia proporcionada per la desfosforilació de l'ATP. El Buffer 2x Ligasa conté ATP. La majoria de polimerases formen part d'aquest grup.

Les DNA ligases uneixen diferents fragments de DNA mitjançant enllaços covalents, si els dos extrems de les dues cadenes de DNA són complementàries (com seria el cas del vector i el gen) és capaç d'enllaçar-les, per a formar una única molècula de DNA. La unió de les dues molècules implica la formació d'enllaços fosfodièsters catalitzats per la lligasa. La DNA lligasa més utilitzada és la T4 ja que permet la unió al plasmidi de fragments cohesius (no simètrics). Per tal de poder donar-se la reacció de lligació:

- El DNA inserit ha de presentar dues zones de tall que la lligasa pot unir al vector (aquestes zones han estat incorporades en la PCR pels primers)
- El vector ha de presentar les àrees específiques per a l'actuació dels enzims de restricció.

Per a poder realitzar la lligació del gen al vector es va seguir el [2] **PROTOCOL DE LLIGACIÓ GEN-VECTOR**

4.2.3.1. FUTURES OBSERVACIONS

Si el gen s'ha insertat correctament tallant l'enzim lacZ les colònies de bactèries (e.coli) seran blanques.

Si el gen no s'ha insertat correctament, fent així que l'enzim lacZ no es trenqui, les colònies e.coli seran blaves.

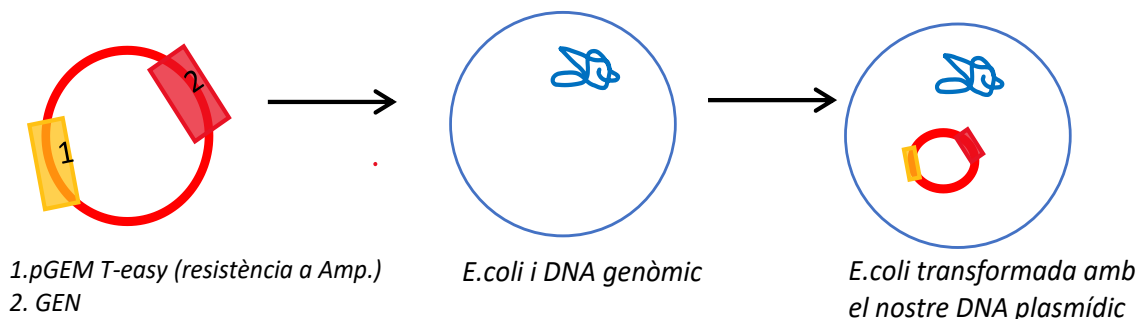
4.2.4. TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS

La transformació és el procés en el qual les cèl·lules capten el DNA lliure present en el medi, aquest fenomen pot ocórrer de manera natural en moltes bacteries. Perquè la transformació es pugui dur a terme la bactèria ha d'estar en l'anomenat estat de competència; és a dir, la seva membrana i paret cel·lular degut a certes condicions fisiològiques presenta alteracions permetent l'entrada d'àcids nucleics a l'interior de la cèl·lula. Els bacteris més utilitzats en laboratori són les *E.Coli*, fent la funció de cèl·lula hoste. L'elecció de les *E.Coli* per a ser transformades és deguda a la seva gran capacitat d'elaboració de còpies (reproducció per fissió binària). Aquestes bacteries poden dividir-se en dues còpies idèntiques en 20 minuts. Les cèl·lules competents poden obtenir-se comercialment o preparant el propi stock (*en aquest experiment el stock ja s'havia realitzat amb antelació i estava guardat a temperatures de -70°C*)

Les bacteries consten del seu propi DNA (DNA genòmic), però a l'introduir el nostre DNA plasmídic pot produir:

- Degradació del DNA genòmic.
- Incorporació al cromosoma bacterià per replicació.
- Atès que el DNA plasmídic és independent al DNA cromosòmic, el plasmidi amb el nostre gen d'interès es trobarà a l'interior de la cèl·lula com a element de replicació autònom. Com a conseqüència, la colònia de bacteries expressarà el vector (resistència a Amp i colònies blaves) i el nostre gen d'interès (EtMIC).

4.2.4.1. PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS



Il·lustració 20. Transformació de cèl·lules competents.

➤ **MEMBRANA PLASMÀTICA BACTERTIANA:**

La membrana plasmàtica bacteriana és un embolcall que rodeja el citoplasma, està format per una bicapa fosfolipídica i per una elevada quantitat de proteïnes (80%). A diferència de la membrana plasmàtica en cèl·lules animals, aquesta manca d'esteroides no conté colesterol. Aquesta característica és deguda a la paret bacteriana que aporta resistència contra la pressió osmòtica.

A la membrana s'hi poden distingir replecs anomenats mesosomes, els quals realitzen funcions d'ancoratge de DNA bacterià, d'intervenció en la divisió cel·lular (bipartició), i a més a més són la zona on es produeix la realització de part de la respiració cel·lular en bacteries aeròbiques.

▪ **COMPOSICIÓ QUÍMICA:**

La bicapa fosfolipídica està estabilitzada per cations divalents incloent Ca^{2+} i Mg^{2+}

Els lípids de membrana són amfipàtics (polars i no polars), formant una barrera selectiva a la permeabilitat, tant per l'entrada i sortida de molècules. Les proteïnes de membrana (integrals i perifèriques) són les encarregades del transport de macromolècules a l'interior de la cèl·lula.

Tot i la composició química de la membrana i la funció de transport que inclou, la cèl·lula en el seu estat natural no permet l'entrada de plasmidis (ADN exterior) ja que és una molècula hidròfila (la membrana plasmàtica és hidròfoba); per tant, la paret bacteriana i la membrana s'han de sotmetre a diferents tipus de components químics o a alts voltatges per tal de tornar al seu estat de competència (formació de porus en la membrana i paret provocant la transformació d'aquestes a un estat permeable)

▪ **MÈTODES PER A L' OBTENCIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS**

- a) Electroporació o electropermeabilització:
- b) Transformació química amb CaCl_2

a) L'ELECTROPORACIÓ O ELECTROPERMEABILITZACIÓ

És l'aplicació d'un alt voltatge (2,5 KVolts) a les cèl·lules de *Escherichia Coli* (DH5 α) durant un curt període de temps afectant la permeabilitat d'aquesta. Quan el voltatge excedeix la **rigidesa dielèctrica**¹ la membrana es despolaritza i es formen els porus. Tot i que les bacteris tenen paret bacteriana, aquesta no afecta a la transformació degut a la seva naturalesa porosa. Si el voltatge aplicat és el corresponent els porus es fixen permetent el pas del nostre plasmidi **pGEM T-easy + EtMIC**.

Aquest procés es duu a terme en el electroporador que crea un camp electromagnètic mitjançant la suspensió cel·lular. Les mostres de bacteris es passen a cubetes amb elèctrodes d'alumini a les bandes.

El clar avantatge d'aquest tipus de transformació és el seu gran èxit, amb una aplicació a milions de bacteris a la vegada produint una efectivitat de la transformació del 100%

b) TRANSFORMACIÓ QUÍMICA AMB CaCl₂

El clorur de calci augmenta l'habilitat dels bacteris d'incorporar el plasmidi al seu interior. Els ions de calci produeixen la formació de porus a la membrana i a continuació per un xoc tèrmic l'ADN plasmídic es veu forçat a entrar a l'interior de la cèl·lula. Un procediment mal realitzat pot comportar que les cèl·lules no siguin prou competents per prendre ADN. S'ha informat que una molècula d'ADN nua està lligada a les molècules receptores de lipopolisacàrids (LPS) a la superfície cel·lular competent. Els cations divalents generen complexos de coordinació amb les molècules d'ADN carregades negativament i els LPS. L'ADN, al ser una molècula més gran, no pot travessar la membrana cel·lular per entrar al citosol. El xoc tèrmic despolaritza fortament la membrana cel·lular dels bacteris tractats amb CaCl₂. A continuació, la disminució del potencial de membrana redueix la negativitat del potencial interior de la cèl·lula, que permet finalment el moviment del DNA carregat negativament a l'interior de la cèl·lula.

Al laboratori, per tal de dur a terme el stock, es va fer servir el mètode de Hanahan. Douglas Hanahan fou l'investigador que va descobrir la tècnica. Per tal d'obtenir el màxim d'èxit possible el protocol s'ha de seguir estrictament i amb molta precaució a l'hora de manipular els bacteris i estris.

Per tal de preparar les cèl·lules es va seguir el [3] **PROTOCOL DE HANAHAN: PREPARACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS**

4.2.4.2. INTRODUCCIÓ DEL PLASMIDI A LA CÈL·LULA COMPETENT

▪ PROTOCOL DE TRANSFORMACIÓ

MATERIALS:

Reactius i productes	Estris
Cèl·lules competents de E.coli	Tubs de propilè freds
Reacció de lligació	Centrifugadora
pGEM T-easy	Micro-pipeta
SOC	Agitador
	Bany

MÈTODES:

- Centrifugar el tub amb la reacció de lligació preparada en l'apartat: **2.2.**
Lligació del gen al vector. Recollir 2 µl del pellet i traspasar-ho en un tub de propilè fred de 17x100mm
- Preparar un segon tub de propilè fred amb 0.1ng de pGEM T-easy intacte (control positiu)

Nota : pots prepara un control negatiu ficant directament les cèl·lules competents en un propilè fred.

- Agafar el stock de bacteris competents conservats a -70°C i descongelar-ho amb precaució en un bany amb gel aprox. 5min

Nota : No es recomana congelar i descongelar les cèl·lules competents, ja que podria perdre la seva eficàcia. Es recomana prendre amb una espàtula una quantitat necessària i la resta ser guardada ràpidament en el congelador.

- Moure suaument, amb tocs suaus amb l'ungla, el tub amb les cèl·lules i amb cura pipetejar 50 µl i traspasar-ho al tub preparat en el pas a)

- e) Pipetejar amb cura 50 µl de les cèl·lules i traspasar-ho al propilè b) (control positiu), en cas d' haver preparat un control negatiu es col·locaran directament 100 µl en un altre tub de propilè.
- f) Mesclar suaument ,amb moviments lents, els tubs i col·locar-los en gel durant 20min.
- g) Incubar les cèl·lules en un bany a 42°C durant 45-50 segons (xoc tèrmic) i ràpidament traspasar-ho a gel durant 2 min

Nota : el xoc tèrmic es duu a terme per tal de tancar els porus oberts de la cèl·lula competent una vegada el plasmidi s'ha introduït. Quan es produeix el xoc la membrana es contrau, produint el segellament dels porus de manera definitiva.

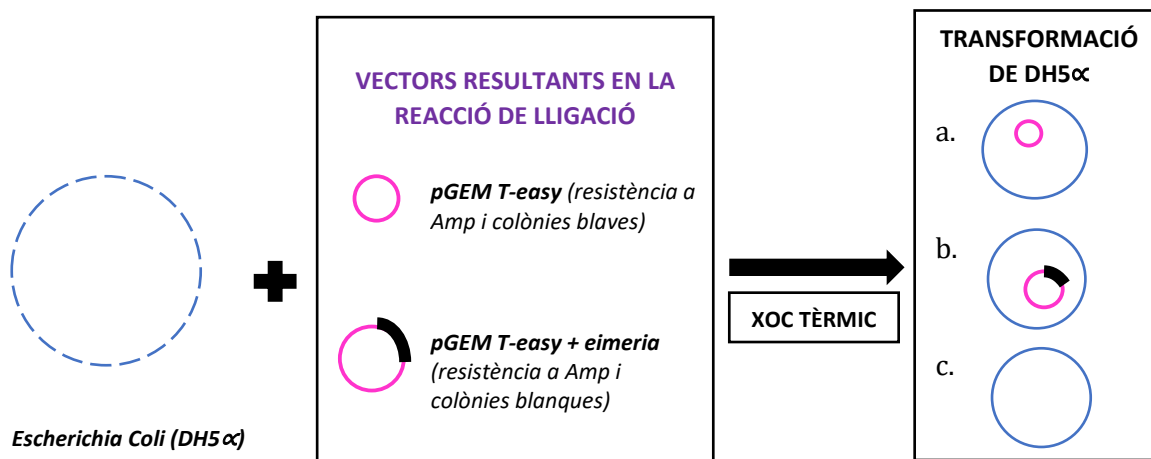
- h) Afegir 950 µl de medi SOC (conté 20mM de glucosa 3,603 g) a temperatura ambient i 900 µl als tubs de propilè de control.

Nota : l'adició del medi SOC permet produir l'expressió del gen de resistència a antibiòtics present en el plasmidi .

- i) Incubar 1.5 hores a 37°C amb agitació de 150rpm

4.2.5. SELECCIÓ I PREPARACIÓ DE LES COLÒNIES

Amb la transformació de les bactèries es poden produir tres variants:



Il·lustració 21. Possibilitats en la transformació de cèl·lules competents.

Quan es realitza la reacció de lligació, no se'ls hi inclou el nostre gen d'interès a tots els vectors, però no es pot dir amb certesa quins s'han transformat i quins no. Per aquest motiu s'utilitza la proliferació de les bactèries en diferents medis per a comprovar si alguna d'aquestes han pogut lligar-se amb el plasmidi modificat.

Els resultats de la transformació de bactèries solen ser:

a) Introducció del vector pGEM T-easy sense modificar

En aquest cas les nostres colònies tindran resistència a l'Ampicilina, ja que aquesta característica és pròpia del vector però aquestes seran blaves, perquè l'enzim lacZ no haurà estat tallat pel gen, per tant s'expressarà.

b) Introducció del vector pGEM T-easy amb el gen Eimeria

Aquestes colònies són el nostre resultat esperat, tindran com a característica la resistència a Ampicilina i les bactèries seran blanques, el nostre gen al lligar-se amb el vector talla l'enzim, per tant produeix que aquest no s'expressi.

c) No introducció de cap plasmidi extern

Les bactèries resultants moriran al ser exposades en un medi amb Ampicilina (antibiòtic) ja que no tenen resistència a aquest.

RECORDA: Si has realitzat grups control:

- **Control negatiu:** les colònies moriran (no introducció de cap plasmidi)
- **Control positiu:** les colònies seran blaves i resistents a Amp (introducció de plasmidi sense modificar) o moriran (no introducció de cap plasmidi)

Per poder realitzar el creixement de colònies de bacteris es poden utilitzar dos medis diferents:

- 1) Ampicilina LB plates
- 2) IPTG/Xgal LB plates

4.2.5.1. AMPICIL·LINA LB PLATES

Composició

- LB
- Triptona
- Sal
- Extracte de llevat

Aquest medi sòlid busca la comprovació de la resistència a Amp de les bactèries transformades. L'ampicil·lina permet seleccionar les bactèries que han incorporat el vector portador o no del gen de resistència a l'antibiòtic.

En aquest cas, les colònies resultants tenen dues variants:

- ❖ Els bacteris a i b sobreviuran (ambdós tenen resistència a Amp, però tenim la incògnita de quin conté el nostre gen)
- ❖ Bacteris c moriran

Les plaques d'ampicil·lina i LB no són un dels mecanismes més utilitzats perquè visualment no se sap si hi podria haver el nostre gen.

Per tal de poder solucionar la incògnita SEMPRE es duu a terme una digestió enzimàtica o bé un PCR.

Per a poder realitzar la preparació de les plaques es van seguir dos mètodes:

[4] PREPARACIÓ DE MEDI LB SÒLID

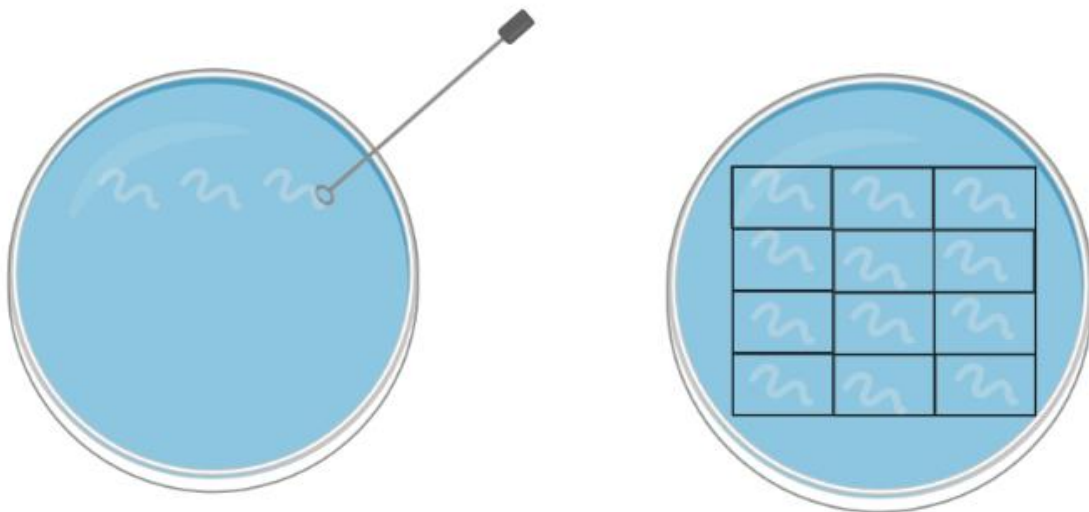
[5] PREPARACIÓ DE L'AMPICIL·LINA EN CONCENTRACIONS 60 µG/µL

• OBTENCIÓ DEL MEDI SÒLID LB AMP

En les plaques de petri preparades amb anterioritat de 25ml per caixa de 9cm Ø, s'estenen 25 µl del medi amb Amp amb l'assa de sembra. Es deixen les plaques de petri preparades a l'estufa a 37°C fins al dia següent. Es guarden les plaques de petri agrupades en paper film i tancades amb parafilm a 4°C.

SEMBRA DE LES PLAQUES DE LB Amp

- Primerament es marquen a la tapa de la placa de petri quadrícules on es sembraran les cèl·lules per així poder numerar les quadrícules i les mostres que després s'analitzaran. També s'hi inclou el nom del gen, data de sembra i tipus de placa.
- Es prenen amb l'assa de sembra cèl·lules transformades preparades amb anterioritat i es desprenen sobre la placa fent dibuixos en zic-zac. Es tapa i s'espera 5 min que s'absorbeixi la suspensió cel·lular.
- Es col·loquen les plaques invertides en la incubadora a 37°C durant 16 hores

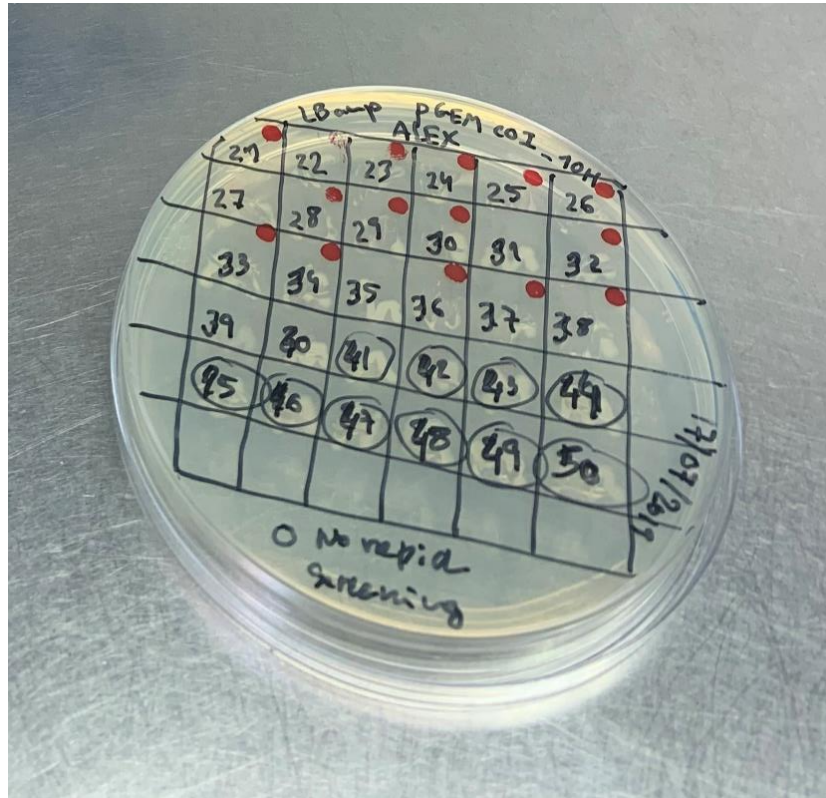


Il·lustració 22. Sembra de cèl·lules transformades en un medi sòlid ric en LB i Amp.

Il·lustració 23. Placa de petri de LB i Amp amb tapa quadriculada.

VISUALITZACIÓ DE LES PLAQUES

En les plaques obtingudes només es poden visualitzar les àrees en les quals les colònies han crescut, és a dir, només es pot deduir quines bactèries han mort per la no inclusió del plasmidi. Si mes no, no es pot visualitzar la diferència entre les bactèries que només han inclòs el plasmidi al seu interior de les que han inclòs també el gen d'interès.



Il·lustració 24. Placa de petri rica en LB i Amp sembrada després de 16 hores d'incubació, preparada per iniciar el procés de digestió.

4.2.5.2. IPTG/ Xgal / Amp LB PLATES

El IPTG (isopropiltio- β -D-galactòsid) és un anàleg de la galactosa que activa l'operó de la lactosa, produint β -galactosidasa.

El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactòsid) és un substrat cromogènic de la β -galactosidasa. En estat íntegre no inclou color (generant-se colònies "blanques"), però el seu producte de digestió, el bromocloroindol, produeix color (generant-se colònies "blaves").

En les plaques obtingudes amb anterioritat es prepara 25 μ l de solució de Xgal amb IPTG i s'estén amb una assa de sembra sobre la placa. Es deixen les plaques de petri a l'estufa a 37°C i s'agrupen embolicades amb paper film.

La reacció que es duu a terme entre l'enzim/substrat produeix colònies amb diferenciació per color, aquelles que contenen el nostre gen, a l'haver trencat l'enzim, el x-gal no podrà produir la digestió expressant colònies blanques

➤ SEMBRA DE LES PLAQUES LB IPTG/Xgal/Amp:

Primerament es marca amb retolador sobre la placa preparada el contingut d'aquesta (LB amb Xgal) ,el dia de la sembra i el gen que s'ha introduït a les cèl·lules transformants.

- Amb una micropipeta es transfereix 250 μ l de les cèl·lules transformades amb el plasmidi (**Introducció del plasmidi a les cèl·lules competents**) i es disposa al centre de la placa de LB i s'estén la mostra amb una assa de sembra. Es canvia l'assa en cada placa que s'ha de sembrar. Hem d'assegurar que les cèl·lules s'hagin estès per tota la placa de petri. Tapar i esperar 5min que s'absorbeixi la suspensió cel·lular.
- Es col·loquen les plaques en una posició invertida i s'incuben a 37°C durant 16h.

➤ VISUALITZACIÓ DE LES PLAQUES

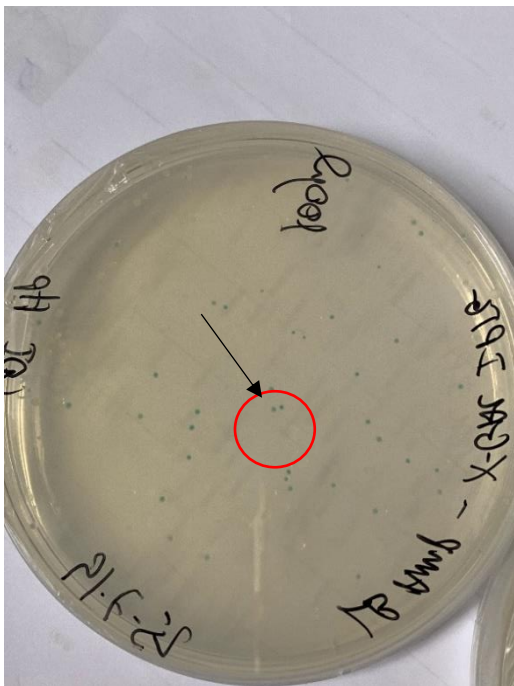
En les plaques obtingudes es pot observar:

- ❖ Color de les bactèries
- ❖ Quantitat de bactèries

Opció a: el plasmidi que incloïa el gen no s'ha introduït correctament a la cèl·lula transformant per tant les colònies, són blaves perquè l'enzim lacZ no ha estat tallat.

Opció b: el gen POTSER s'ha inclòs en les bactèries, per tant les colònies són blanques ja que l'enzim lacZ ha estat tallat en el moment de la lligació.

Les colònies blanques no tenen una certesa del 100% ja que es pot haver integrat l'opero de la catosa en el moment de digestió amb el Xgal.



Il·lustració 25. Colònies blaves (no presencia del gen)



Il·lustració 26. Colònies blanques (possibilitat de presencia del gen)

4.2.6. DIGESTIÓ ENZIMÀTICA I PCR

La digestió enzimàtica és el procés d'alliberació del nostre gen el qual està lligat al vector i introduït a les cèl·lules transformant. Els vectors estan formats per zones de restricció que són seqüències específiques d'una molècula de DNA que produeix l'acció dels enzims de restricció. Aquests enzims també anomenats endonucleases de restricció són proteïnes amb funció catalitzadora les quals actuen trencant els enllaços fosfodièster dels dos brins de la seqüència reconeguda de DNA (diana de restricció), produint l'alliberament del gen introduït. En els plasmidis existeixen dues zones; l'acció dels enzims de restricció es usat per la bactèria com a sistema de defensa contra la invasió de DNA exogen.

Els enzims de restricció poden ser diferents en cadascuna de les zones de restricció, però en aquest cas, el vector pGEM- Teasy utilitza la mateixa endonucleasa per ambdós àrees (EcoRI).

L'EcoRI produeix el tall del DNA de manera cohesiva, es a dir, produeix la separació del DNA de manera no simètrica, escalonada. La seva nomenclatura prové degut a que es aïllada dels bacteris *Escherichia Coli*

Enzim de restricció	Origen bacterià	Seqüència de reconeixement	Resultat del tall de DNA
EcoRI	Escherichia Coli	5' G↓AATTC 3' 3' CTAA↓G 5'	5'---G AATTC---3' 3'---CTAA G---5'

El producte que s'obté de la digestió completa es una parella de fragments corresponents al plasmidi i DNA (3000bp i 600bp respectivament). S'analitza amb una electroforesi de gel d'agarosa el resultat de la digestió.

Cal recordar que les bactèries amb el gen EtMIC estaven proliferant en les plaques LB, per tant, per tal de poder analitzar aquests cultius primer s'haurà de elaborar un creixement bactèria en medi líquid de LB.

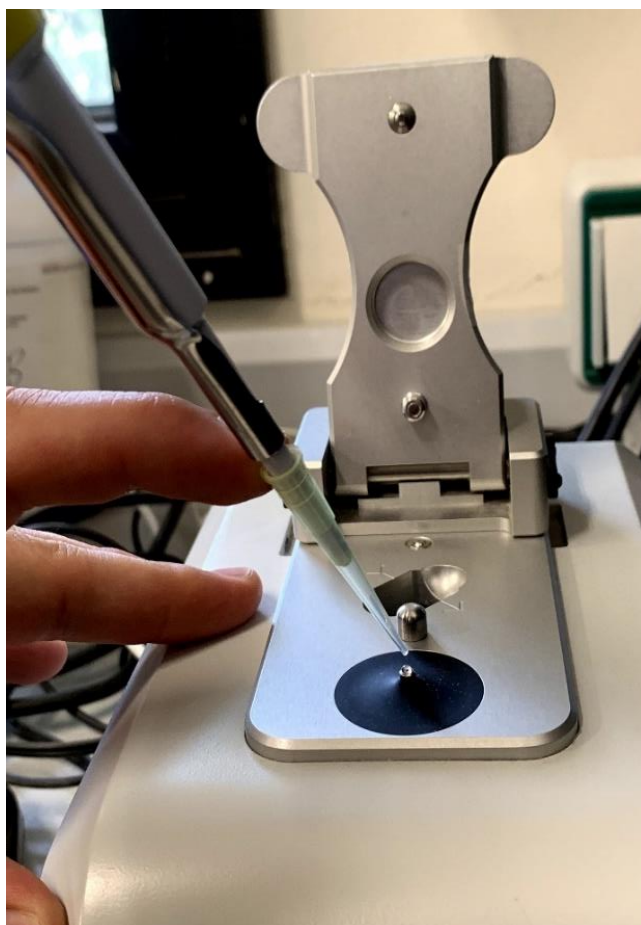
[6] PROTOCOL DE CREIXEMENT BACTÈRIA EN MEDI LÍQUID DE LB.

➤ MÈTODES A SEGUIR EN LA DIGESTIÓ ENZIMÀTICA

a) ESPECTOFOTOMETRIA EN NANODROP

L'espectrofotometria es una tècnica la qual usa l'adsorció de la longitud d'ona per part de la mostra (dissolta en aigua) per a crear una relació de valors. Determina la concentració de DNA prenen com a mostra 1 µl. Les mostres utilitzades, son mostres d'EtMIC en dissolució aquosa. El DNA té una absorció determinada (de 260nm), segons la longitud de l'ona que cada mostra absorbeix es crea una corba de valors segons la comparació amb els resultats esperats. Mitjançant aquesta corba (pic més alt als 260nm) es pot establir quina es la mostra amb més concentració i per tant la utilitzada en la digestió. Primer s'ha de crear un BLANK d'H₂O per tal de marcar impureses que es podrien detectar com a DNA ja que aquest es troba dissolt en H₂O. Després, amb cura, s'eixuga el líquid que ha quedat en la punta del Nanodrop i es disposa amb una micropipeta 1 µl de cadascun dels DNA (secant cada cop que es canviï de mostra). Finalment s'obté la mostra d'EtMIC amb més concentració: 150ng/µl

Consegüentment s'obtenen 8 µl de DNA, per tant en cadascuna de les mostres s'haurà d'incorporar 20 µl de Master Mix.



Il·lustració 27. Espectrofotometria Nanodrop

b) PROTOCOL DIGESTIÓ:Materials i reactius**Materials i reactius per al procés de digestió:**

- Micropipeta
- 22 tubs de microcentrífuga de 2mL
- 11 tubs de microcentrífuga amb filtre 2mL
- Kit de digestió enzimàtica
 - Solució A
 - Solució B
 - Solució C
 - Solució de rentat
 - Solució d'elució
- Centrifugadora

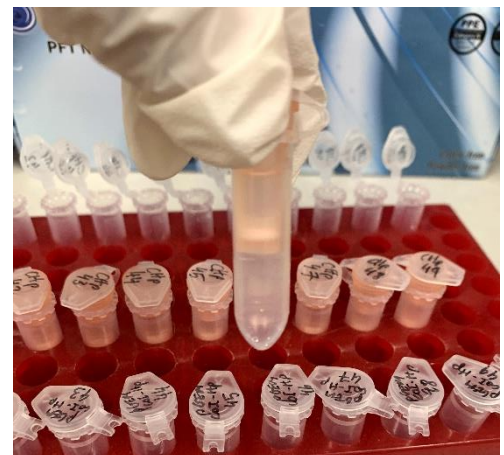
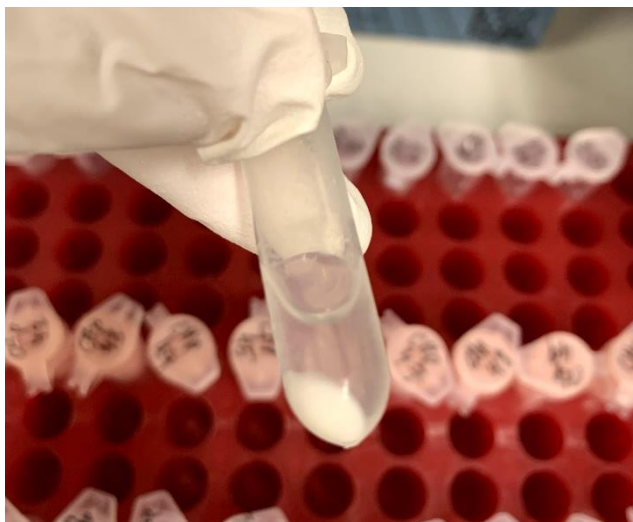
Reactius per a la preparació del Master-Mix

Buffer 10x	2 μ l
Enzim EcoRI	1 μ l
H ₂ O	9 μ l
DNA 1 μ g	X μ l

- Traspasar el contingut dels tubs de falcon de 15mL després de 16h a cadascun dels tubs de microcentrífuga de 2mL marcats amb el nombre corresponent.
- Centrifugar durant 1min a velocitat màxima, per a pel·letitzar les cèl·lules. Tot seguit s'aboca el sobrenedant.
- Tornar a suspendre el pellet de les cèl·lules afegint 250 μ l de Solució A i agitar la mostra al vòrtex, fins que el pellet estigui completament dissolt.
- Afegir 250 μ l de la Solució B, tancar cadascun dels tubs i moure la mostra invertint-la 5 cops.

Nota : si se sobrepassa els 5min es produirà la lisis de les cèl·lules.

- Afegir 250 µl de la Solució C, tancar el tub i moure la mostra amb moviments invertits 4-6 vegades. Centrifugar durant 5min a màxima velocitat.
- Traspasar el sobrenedant als tubs de microcentrifuga amb filtre i incubar-los 1min en el filtre.
- Centrifugar 1 min a màxima velocitat. Abocar el sobrant traient el filtre.
- Afegir 750 µl de la Solució de rentat. Centrifugar 1min a velocitat màxima i descartar el sobrant. Repetir aquest procés dues vegades.
- Centrifugar durant 3 min a velocitat màxima per acabar d'eliminar els residus l'etanol.
- Col·locar el filtre en un nou tub de 1.5mL i afegir 100 µl de Solució d'elució al centre de la superfície del filtre. Incubar durant 1min a temperatura de l'habitació.
- Finalment centrifugar a 11.000 x g durant 1 min per a eluir el DNA plasmídic.



Il·lustració 28. Pellet i filtre digestió

c) PREPARACIÓ DEL MASTER MIX I TINCIÓ DE LES MOSTRES

Com que tenim 11 mostres i a cadascuna d'elles se li ha d'afegir 20 µl de Master Mix, es prepararan 260 µl (sempre s'han de comptar dues mostres de més com a marge d'error).

- En un tub de microcentrifuga de 2mL es pipetegen 13 µl d'enzim de restricció EcoRI, 104 µl de DNA, 117 µl d'H₂O i finalment 26 µl de Buffer 10X. Es canvia de punta en cada substància que s'afegeix i com a últim pas, es mesclen les substàncies succionant i alliberant el líquid amb la pipeta diversos cops.
- Es reparteixen 20 µl de la Master Mix en cadascuna de les mostres obtingudes.

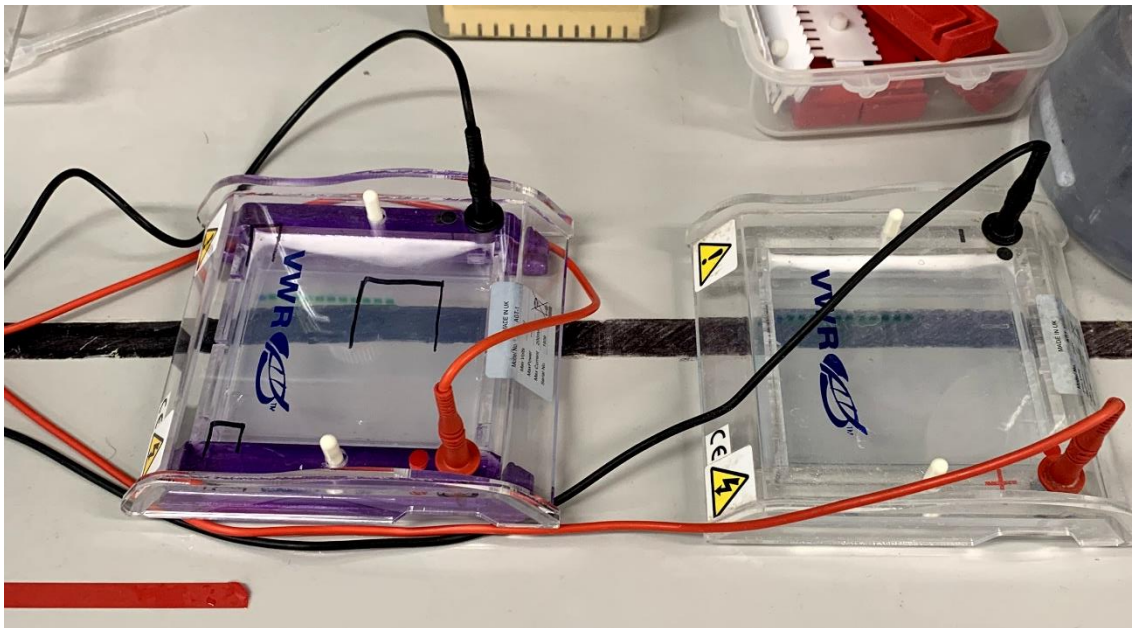
El buffer 10x està format per 30% glicogen i 0.25% Xylene cyanol FF, per la qual cosa les mostres tindran una tinció verda. El glicogen atorga pes molecular al DNA.

ESPECTROMETRIA EN GEL D'AGAROSA

Per a realitzar l'espectrometria en gel d'agarosa per a la digestió es va seguir el mateix protocol que en l'espectrometria de la PCR.

En aquest tipus de gel, com que es tracta d'una digestió, apareixeran dues marques, una entre els 600-750bp corresponent a l'EtMIC i una als 3000bp corresponent al vector pGEM T-easy. Un cop ha finalitzat el procés de córrer el gel, es visualitza en la làmpada ultraviolada.

Per a finalitzar la comprovació de la multiplicació del nostre gen en els bacteris, s'elabora un PCR de les mostres que han obtingut les dues marques diferenciades.



Il·lustració 29. Electroforesi en gel d'agarosa

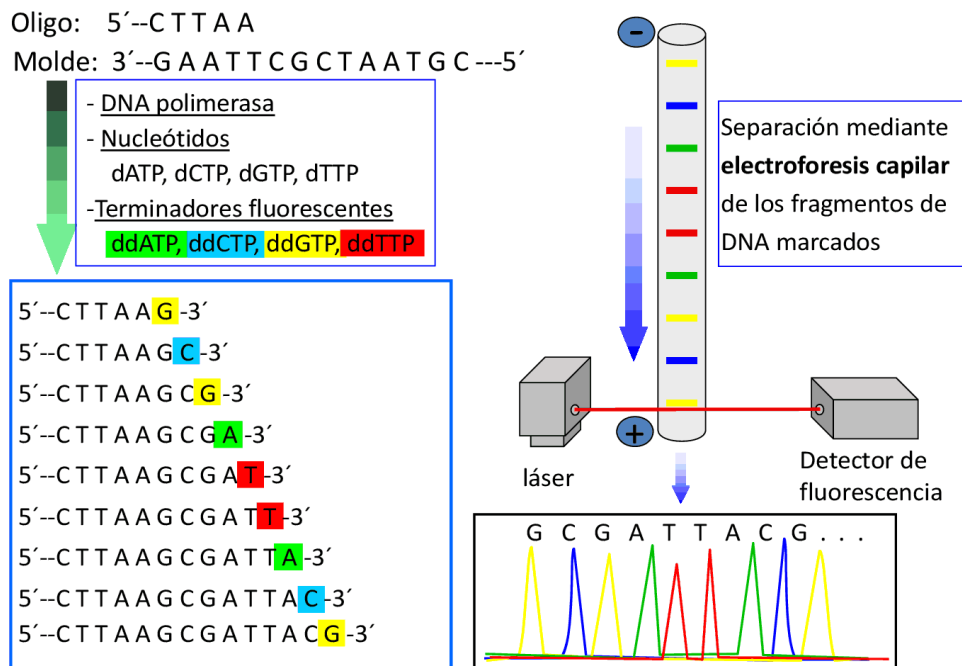
4.2.7. SEQÜENCIACIÓ DE SANGER

Després de l'obtenció de còpies del nostre gen d'interès s'ha de comprovar la seva coincidència amb la seqüència de nucleòtids del gen no copiat, ja que en la PCR es poden haver produït errors en el procediment de creació de la cadena complementària.

Amb els gens obtinguts en la digestió, es torna a produir una PCR col·locant en els extrems uns encebadors específics per a enviar la mostra a seqüenciar. La seqüenciació de la molècula de DNA consisteix en la identificació dels nucleòtids que formen la cadena de DNA, és a dir, reconèixer l'ordre de disposició d'aquests.

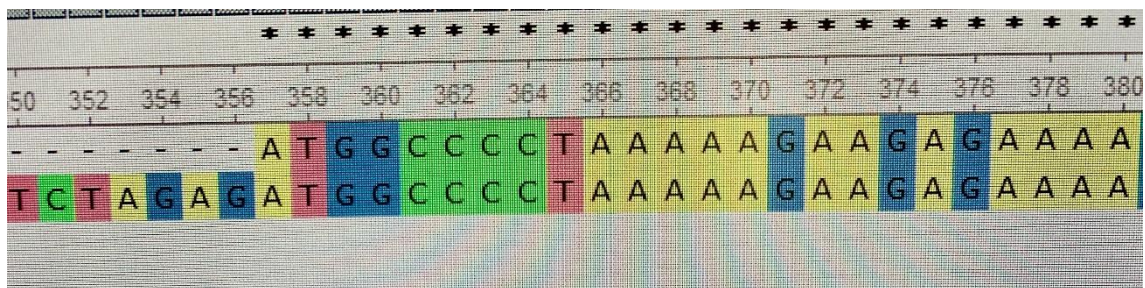
La seqüenciació de Sanger és un mètode que fou dissenyat per **Fred Sanger el 1977**. Aquest és un mètode enzimàtic que permet determinar la seqüència del motlle a mesura que sintetitza el bri complementari. Aquesta tècnica utilitza:

- Cadena de DNA senzilla que actua com a motlle.
- Encebadors per iniciar i finalitzar la síntesi d'aquest DNA.
- Quatre tipus de desoxiribonucleòtids trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Taq-polimerasa (permet l'automatització del procés).
- Quatre tipus de desoxiribonucleòtids trifosfat amb fluorescència, utilitzats per la polimerasa per a constituir el bri complementari, però un cop incorporats impedeixen l'acció dels nucleòtids que utilitza l' electroforesi capil·lar.



Il·lustració 30. Seqüenciació de Sanger

Aquesta conté en un tub cadascun dels components. Quan la Taq-polimerasa afegeix un ddNTP marcat a la cadena motlle la reacció s'atura, generant fragments de diverses longituds amb el mateix ddNTP terminal. Cada ddNTP està marcat amb un color fluorescent diferent que no intervé en la reacció de la polimerasa i emet llum amb una longitud d'ona específica. Aquesta reacció és cíclica per tant, en cada cicle s'obtenen diferents fragments marcats amb una molècula de color diferent segons el seu ddNTP terminal. Cadascun dels fragments obtinguts se separen mitjançant una electroforesi capil·lar. Quan el fragment arriba al capil·lar excita la molècula amb un raig làser que segons la fluorescència emesa pel ddNTP terminal estableix de quin nucleòtid es tracta. Amb aquest mètode s'obté un cromatograma i un electroforograma que mostra els pics amb l'ordre dels nucleòtids detectats, és a dir, la seva seqüència.



Il·lustració 31. Comparació de la mostra seqüenciada amb la original del gen EtMIC.

4.2.8. PREPARACIÓ DELS MICROPROJECTILS

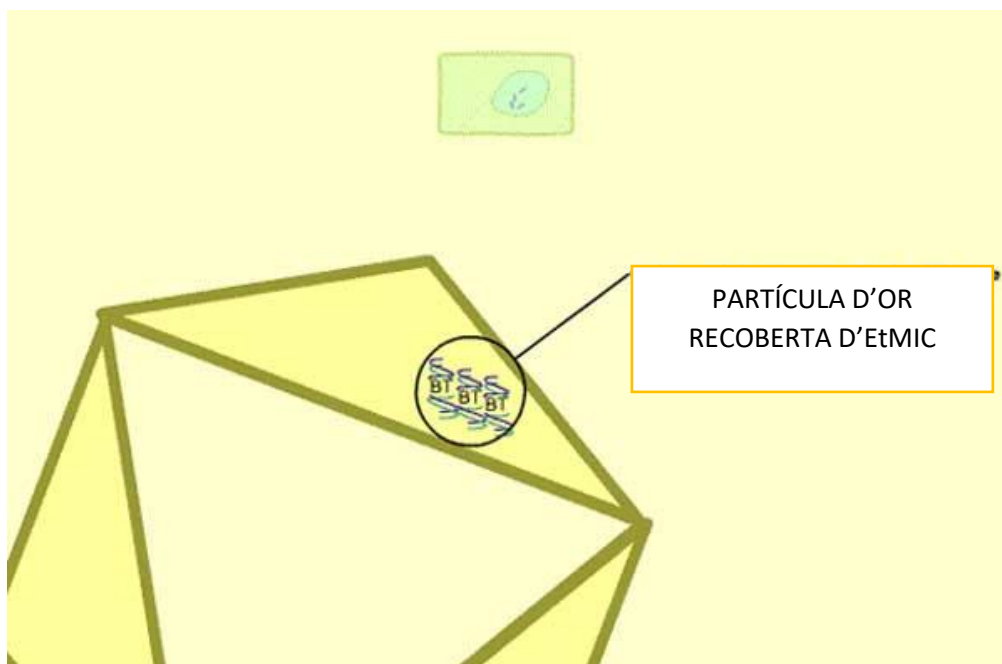
Després de la seqüenciació, les mostres concorden amb l'ordre de nucleòtids del gen EtMIC, amb la qual cosa aquest gen copiat amb el plasmidi es pot utilitzar per al bombardeig dels embrions d'arròs. Per tal de poder introduir a l'interior del genoma de l'arròs el nostre gen, s'ha de preparar una solució que pugui travessar correctament la paret cel·lular de l'embrió.

Les partícules d'or presenten la capacitat d'adherir-se al plasmidi que conté el gen i d'introduir-se en el genoma embrionari.

Materials

- ❖ Tub de centrifuga de 1,5mL
- ❖ 20 µl de DNA plasmídic
- ❖ Partícules d'or 0.6 µ
- ❖ Etanol 100%
- ❖ CaCl₂
- ❖ Espermidina (0.1M)
- ❖ Aigua destil·lada
- ❖ Làmina transportadora

Per a poder realitzar la preparació dels microprojectils es va seguir el **[7]PROTOCOL DE LA GOLD PREPARATION**



Il·lustració 32. Gold Preparation

4.3. BOMBARDEIG

La creació d'organismes modificats genèticament havia estat exclusiu en tècniques convencionals de creuament (hibridació sexual), però els avenços de la biotecnologia vegetal han fet possible l'aparició de nous mètodes per a la millora genètica. A més a més, el sorgiment i increment del desenvolupament de cultius in vitro produí la capacitat de regeneració de plantes completes (teoria de la totipotencialitat cel·lular), fent possible com a conseqüència la manipulació genètica d'una forma més directa i segura.

Actualment existeixen diferents tècniques per a inserir el gen d'interès en un altre organisme (planta) que desxifri la nova informació adquirida per a produir una proteïna que li permeti expressar una nova propietat o tret. Aquests mètodes són:

- Mètode directe: **Agrobacterium**. Permet l'entrada de DNA exogen a la planta mitjançant processos químics o físics (les bacteries *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes* modificades genèticament infecten la cèl·lula vegetal introduint de manera natural el DNA d'interès).
- Biobalística o bombardeig de partícules per "gene gun": Aquest mètode consisteix en la impulsió a altes velocitats de micro-projectils. Aquest mètode inclou diversos avantatges respecte al mètode directe. Aquest és ràpid i a més a més no es necessita de cultiu in vitro de protoplasts.

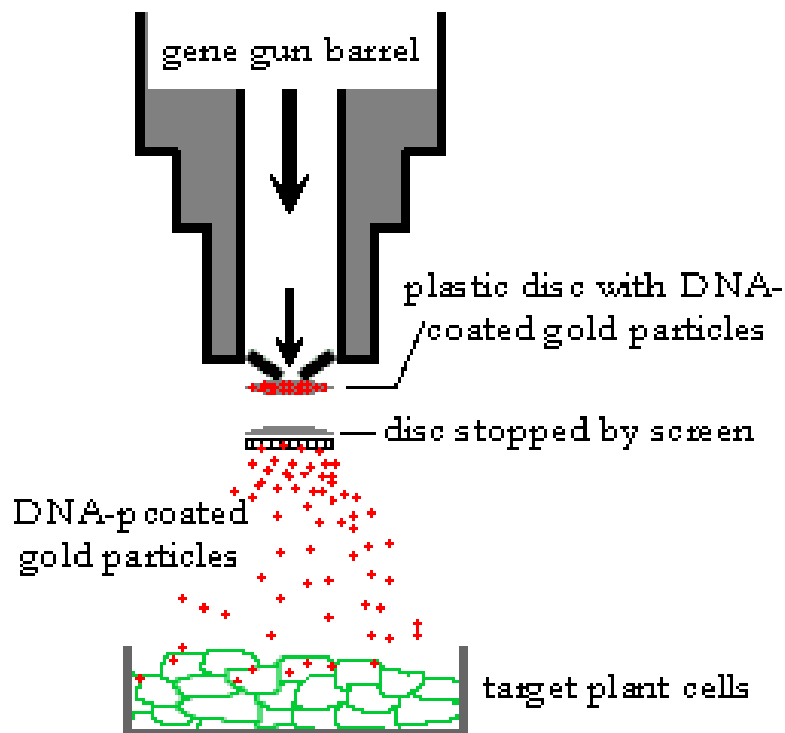
La investigació de mètodes d'acceleració de partícules fou impulsada per John Sanford, Theodore Klein, Edward Wolf i Nelson Allen als anys 80. Aquest procediment utilitza micro-partícules metàl·liques (partícules d'or) cobertes per DNA o RNA (micro-projectils). Aquests són accelerats a altes velocitats provocant que puguin penetrar la paret i la membrana cel·lular vegetal. Quan el DNA o RNA es desprèn de les partícules metàl·liques, aquest RNA pot ser traduït o el DNA pot ser transcrit i traduït. L'expressió transitòria es pot observar 24-72 hores després del bombardeig. Si el DNA bombardejat és acceptat per la cèl·lula, pot integrar-se de manera estable i ser recombinat aleatòriament als cromosomes. La transformació estable és poc freqüent per la qual cosa es necessari utilitzar processos de selecció in vitro dels teixits (en aquest cas callus) per distingir les cèl·lules transformades de les que no.

Els primers mètodes de transformació per bombardeig anomenats canons gènics utilitzaven marco-projectils, que contenien una bala de plàstic que impulsava els micro-projectils. La pistola gènica aparegué l'any 1996. Aquesta es diferencia dels canons gènics perquè poden transformar una àrea delimitada per la mida de la càmera i permeten treballar sense la necessitat de fer el buit al teixit vegetal. A més a més,

permet treballar a distàncies molt properes de l'organisme que es vol transformar. La pistola treballa també mitjançant micro-projectils d'or envoltats de DNA o RNA, els quals són precipitats en un cartutx i propulsats mitjançant la descàrrega elèctrica del gas comprimit (heli). Tot i ser un mètode ràpid, el bombardeig de partícules té molt poca efectivitat, es necessita grans quantitats d'organismes transformats per a poder trobar-ne un que pugui regenerar-se completament i expressar el gen introduït.

La pistola gènica o "gene gun" està formada per un cartutx cilíndric, similar al d'un revòlver, al qual se li incorporen les mostres de micro-projectils carregades en la làmina transportadora. Abans de poder introduir la làmina, aquesta ha d'haver evaporat l'etanol de la dissolució de partícules d'or revestides de DNA. El cartutx està format a més a més dels micro-projectils d'una malla protectora, a la qual se li adherirà la làmina en el moment que es produeixi la descompressió de l'heli. Les partícules d'or sortiran per la càmera de la pistola gènica i s'introduiran en el teixit vegetal.

La biobalística s'utilitza per a transformar diversos tipus de plantes, algunes d'aquestes són: arròs, panís, ordi, blat, tomàquet, plàtan, mango... Aquesta tècnica ha permès transformar plantes que són recalcitrants, és a dir, tenen una gran problemàtica per a germinar en el sòl i poden ser emmagatzemades durant molt de temps (perdria la viabilitat de l'organisme transformat).



Il·lustració 33. Bombardeig amb gene gun.

L'aplicació més comú de transferència de gens mitjançant el bombardeig és la creació de vacunes. Ja que la tècnica és capaç d'entregar la quantitat suficient de DNA per a induir la resposta immunitària contra el producte genètic. Produïnt d'aquesta manera la superioritat d'aquest mètode de transformació envers els altres en l'àmbit de la vacunació amb DNA (Wang, et al., 2008). Convé ressaltar la prometedora aplicació en models preclínics per a la vacunació de ratolins, conills, primats no humans, a més d'assaigs clínics en humans (Fuller, Loudon i Schmaljohn, 2006).

L'avantatge principal que presenta aquest mètode és la capacitat de poder ser utilitzada en diversos teixits vegetals, com ara embrions, cèl·lules somàtiques, pol·len, teixits meristemàtics, fulles...

En aquest cas, per a la transformació dels embrions d'arròs madurs, aquests es van traspasar a la placa d'osmòticum, que delimita l'espai del canó de la pistola gènica. Es van produir 3 disparos de 15kV en tres plaques d'osmoticum diferents, dues vegades cadascuna amb intervals de 4 hores. Es van poder observar en els embrions madurs bombardejats les fines partícules d'or (s'aprecien espurnes de brillantor). Es col·loquen les plaques després del bombardeig en fosc.



Il·lustració 34. Gene gun.

5. EXPRESSIÓ I DETECCIÓ DEL GEN A L'ARRÒS TRANSFORMAT

5.1. REGENERACIÓ DE LA PLANTA AMB LA MOLÈCULA

5.1.1. ETAPA FOSCA DESPRÉS DEL OSMOTICUM

5.1.1.1. MSP (PROLIFERATION MEDIUM)

Temps en el medi: 2 dies

Els embrions es traspassen després d'una nit en osmoticum, de nou a l'embrió, ja que aquest després del bombardeig es troba en condicions molt dèbils i inestables. El medi de proliferació és òptim per al seu desenvolupament, si els embrions transformats poden adaptar-s'hi, garanteix una possible producció dels callus. Cal recordar la presència de concentracions elevades de sacarosa en el medi (12%).



Il·lustració 35. Embrions en MSP

5.1.1.2. SELECCIÓ DELS CALLS

La selecció és una part fonamental per a la obtenció de plantes transgèniques ja que no totes les cèl·lules es transformen. S'elaboren subcultius a mesura que es poden diferenciar aquests segments transformats. El traspàs dels calls que es creuen transformats a el mateix medi fresc es produeix per mantenir la seva conservació, evitant l'envelliment d'aquest. A partir d'aquests calls es formaran els brots (organogènesi). La diferenciació entre les àrees transformades de les que han mort és notable en el color del call i en la seva textura. Un call que conté zones marronoses o molt aquoses, determina la no transformació d'aquestes seccions, per tant s'hauria de descartar la zona que presenta aquests aspectes. En canvi, un call que presenta una

textura més consolidada (organització de les cèl·lules) i d'un color os/ groguenc significa que ha inclòs el DNA en el seu genoma. Els medis de selecció inclouen ampicil·lina (antibiòtic), que és el factor deliberant per detectar els teixits transformats (cal recordar que el vector de clonació presenta la resistència a ampicil·lina com a element determinant).

- **MSS (SELECTION MEDIUM) : Primera selecció**

Temps en el medi: 14-15 dies

Es prenen les plaques en proliferació i es traspassen els embrions a les plaques amb el medi de selecció (el traspàs es produeix en una làmpada de flux i amb pinces esterilitzades). En aquest punt, els embrions s'han recuperat del bombardeig i possiblement han inclòs el DNA en el seu genoma. La presència d'ampicil·lina en el medi produirà que els embrions desenvolupin els calls o bé morin.

- **MSS (SELECTION MEDIUM): Segona selecció**

Temps en el medi: 14-15 dies

Després de les dues setmanes en el medi de selecció, els embrions desenvolupen la seva resposta davant l'ampicil·lina. Alguns dels embrions presenten calls, en canvi d'altres s'han tornat d'un color marronós, clar indicador de la seva mort . Amb unes pinces en una làmpada de flux laminar es "tallen" els calls emergents de les llavors i es passen a una nova placa de selecció. La placa s'ha d'enumerar per tal d'identificar de quin call es tracta.

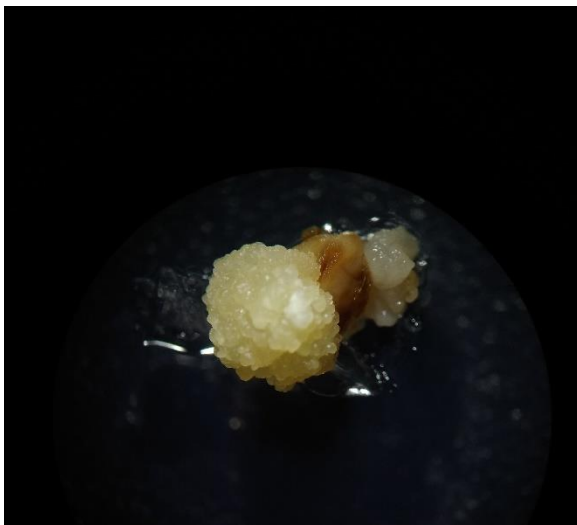
- **MSS (SELECTION MEDIUM): Tercera selecció**

Temps en el medi: 14-15 dies

En aquesta última selecció dels calls, s'identifiquen les zones no transformades i es descarten. Les agrupacions de cèl·lules transformades es traspassen amb pinces esterilitzades a un nou medi de selecció. Cadascun dels petits calls extrets del primer s'agrupen en fila deixant un espai entre ells i es marquen amb el nombre corresponent. En la tercera selecció ja és possible aplicar tècniques de comprovació de presència de la proteïna d'interès (Elisa i Western) Aquesta és l'última etapa del procés en medi fosc. Si es detecten zones no transformades, és possible de tornar a produir una selecció.



- **PRIMERA SELECCIÓ**



- **SEGONA SELECCIÓ**



- **TERCERA SELECCIÓ**

5.1.2. ETAPA LLUMINOSA

El cultiu in vitro en llum es produeix per a la proliferació de les cèl·lules transformades seleccionades. Aquestes cèl·lules que han demostrat la possible introducció del gen (s'han desenvolupat en medis amb antibiòtic) en contacte amb la llum adquiriran un to verdós. Els cloroplasts que les cèl·lules vegetals contenen s'expressaran produint aquesta coloració. A més a més, en aquestes posteriors etapes, els calls seran sotmesos a medis amb presència d'hormones de creixement, produint la possible proliferació del brot. Quan es visualitza un brot considerat, aquests són traspassats a medis més amplis per al seu arrelament. Finalment es produirà el traspàs al sòl.

5.1.2.1. MSR (REGENERATION)

Temps en el medi: 14-15 dies

Es prenen els calls de l'última selecció en medi fosc i es passen a un medi de regeneració amb pinces esterilitzades a la làmpada de flux laminar. Aquest medi conté BAP, NAA i ampicil·lina. En la regeneració els calls adquireixen coloració verda per la clorofil·la i es comença a desenvolupar el cotilèdon. Aquest brot es crea de nou des del teixit transformat. L'arròs es caracteritza en la seva transformació degut a la ràpida i fàcil regeneració partint dels calls per a la producció de plantes totals. En aquesta etapa també es poden elaborar subcultius, ja que alguns calls només adquireixen la coloració verda però no arriben a generar el cotilèdon.

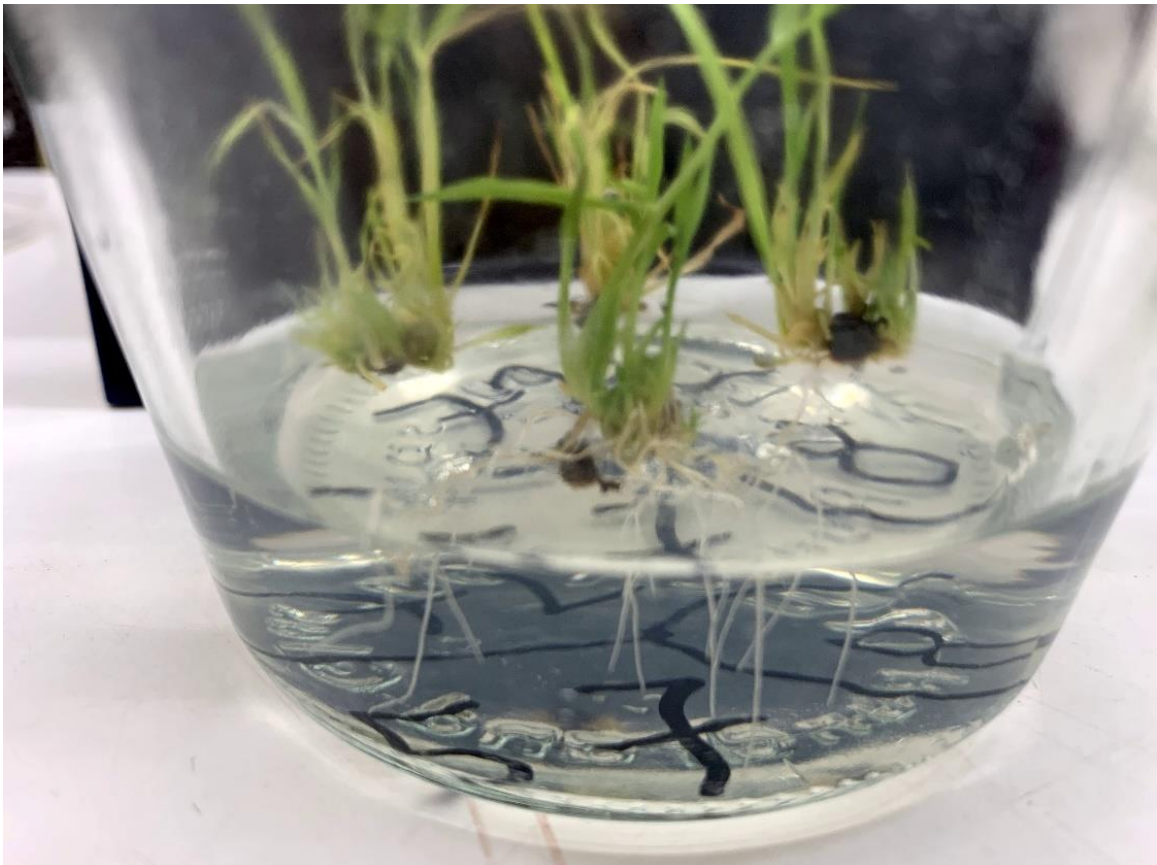


Il·lustració 36. Calls en MSR

5.1.2.2. ROOTING:

Temps en el medi: -

Quan en el medi MSR s'observa brots de 1cm-2cm es traspassen a la placa de medi d'arrelament. Aquest medi també anomenat HSM, produeix el desenvolupament de les arrels per al traspàs al sòl. El medi conté un Auxin que produeix l'elongació de les arrels. Quan els brots presenten 4 o 5 cm de longitud, es traspassen a gerres de medi de restauració. Finalment quan la planta es considera apta, es traspasa al sòl.

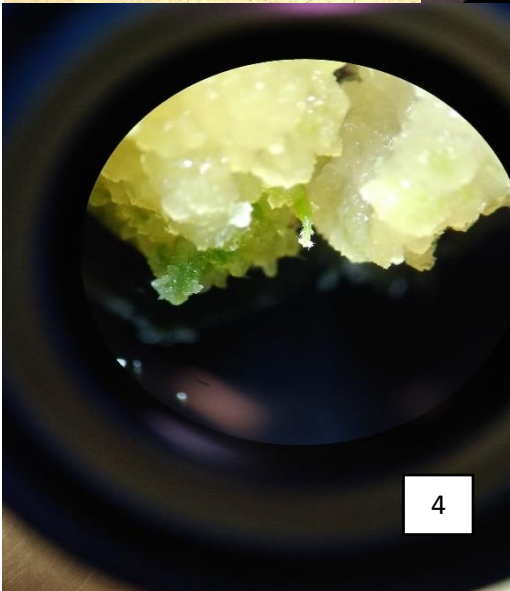
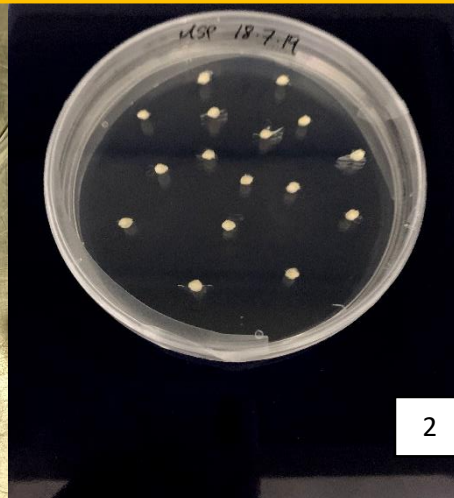
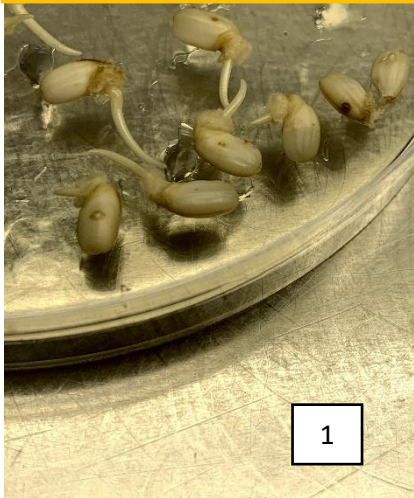


Il·lustració 37. Rooting

5.1.2.3. TRASPÀS AL SÒL:

Es preparen 4 parts de substrat per 1 de terra, preparada amb aigua el dia anterior. El traspàs al sòl dels brots amb arrels no asseguren la viabilitat de la supervivència de la planta. En condicions in vitro, aquesta no estava sotmesa a factors externs com la calor i el fred i bacteris en l'ambient i per tant, existeix la possibilitat de la mort de la planta.

PROCÉS DE TRANSFORMACIÓ DE L'ARRÒS



- 1- Extracció d'embrions
- 2- MSP
- 3- Bombardeig
- 4- MSS
- 5- MSR
- 6- Rooting
- 7- Traspàs al sòl

5.2. DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA AMB ELISA

5.2.1. TÈCNICA ELISA

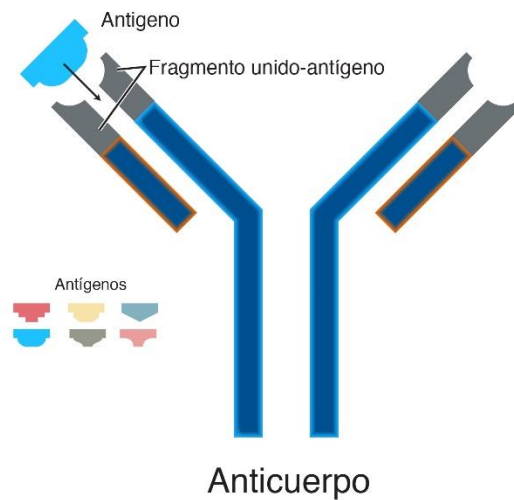
La utilització dels anticossos monoclonals va millorar la capacitat de diagnosticar un major nombre de malalties. La presència d'anticossos és un indicador de la presència de l'antigen. L'ELISA és un immunoassaig que és usada com a mètode de detecció de la formació d'un immunocomplex, que es produeix en la unió d'un anticòs i un antigen. Aquesta té múltiples funcions: detecció de drogues o fàrmacs en un sèrum, estudi de malalties, obtenció d'anticossos monoclonals i aplicacions en la indústria alimentària.

El sistema immunitari és el complex format pel conjunt d'organismes, teixits i molècules en els processos d'immunització. Aquest es caracteritza pel reconeixement de molècules externes a l'organisme, és a dir antígens, amb els qual es desencadenen un seguit de processos per a produir la seva neutralització, elaborant la resposta immunitària, desenvolupada pels anticossos.

Els anticossos són biomolècules proteiques (proteïnes) que són produïdes pels limfòcits B (es formen a la medulla òssia en els mamífers) són els responsables de la resposta immunitària humoral. Els limfòcits són cèl·lules de la limfa procedents de les cèl·lules mare). Aquests són immunoglobulines (Ig) amb una estructura bàsica de quatre cadenes polipeptídiques: dues de les quals són lleugeres i dues cadenes pesants. Les primeres es troben enllaçades a les cadenes pesants mitjançant ponts disulfur i a molècules d'oligosacàrids. Es forma una molècula tridimensional en forma de Y, amb la tija formada per una part de les cadenes pesants i radicals àcid terminals i els dos braços per la resta de cadenes pesants unides a les lleugeres. El lloc d'unió amb l'antigen, són els extrems terminals de les cadenes. La molècula presenta dues arres d'unió degut a la presència de dos braços amb zones terminals, però només una de les zones és viable per a la unió òptima amb l'antigen específic. Existeixen diferents tipus d'immunoglobulines: IgA, IgD, IgG, IgM, i IgE.

Els antígens són qualsevol tipus de molècula o substància que pugui originar la resposta immunitària. Aquestes normalment són macromolècules que poden presentar una estructura lipídica, proteica o de polisacàrid. Poden actuar com a antígens microorganismes externs (bactèries, paràsits (*Eimeria Tenella*)...) o molècules d'un altre individu de la mateixa espècie. Aquests presenten una zona específica d'unió a la membrana dels anticossos anomenada determinant antigènic. Existeixen dos tipus d'antígens segons si presenten només un determinant antigènic, és a dir, només

s'enllaça amb un anticòs, o bé presenten múltiples àrees d'unió, presentant diferents llocs d'unió amb els anticossos determinants.



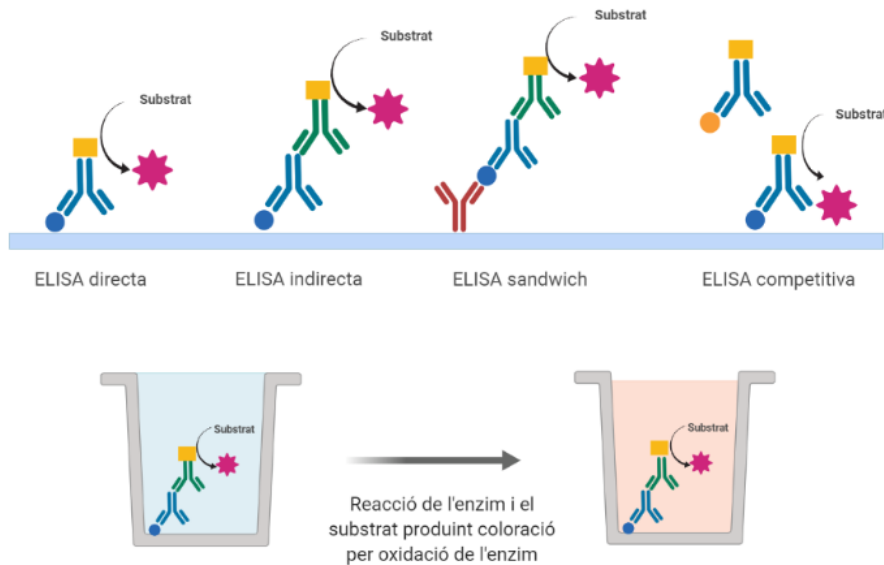
Il·lustració 38. Antigen- Anticòs

La tècnica ELISA es basa en la fixació de la reacció antigen-anticòs (segons el tipus d' ELISA que s'utilitzi l'ordre de unió pot ser diferent) en la multiplaca o gradeta, normalment de 96 cel·les. En el cas de la fixació de l'antigen a la base d' una de les cel·les, reacciona amb un anticòs anomenat anticòs primari que el neutralitza, o bé en el cas contrari (fixació anticòs de detecció), amb un antigen amb el que presenti especificitat. A més a més es fixa un altre tipus d'anticòs que reconeix l'antigen i s'uneix, anomenat anticòs secundari. Els anticossos monoclonals poden ser d'origen animal (ratolí, dromedari, cavall...), aquests s'obtenen amb la introducció dels antígens que es volen analitzar en l'organisme, produint consegüentment la resposta immunitària i l'aparició dels anticossos específics que haurien de neutralitzar la molècula externa introduïda. S'extreu una mostra de sang, que conté els enzims produïts pels limfòcits B, i es purifica obtenint els anticossos primaris que reaccionaran amb l'antigen d'interès. Altrament, en els anticossos conjugats que es poden trobar comercialment, s'hi troba adherit a la seva tija un enzim específic (PHR) que quan es produeix la unió amb el substrat cromogènic (formació del complex enzim-substrat) dona lloc com a producte a la coloració del medi. Segons la quantitat de coloració present en cadascuna de les cel·les de les plaques de ELISA s'estableix un valor determinat.

Utilitzant el mètode de l' ELISA es podrà detectar la presència i la quantitat de l'antigen EtMIC a l'interior de les plantes d'arròs transformades, garantint l'èxit o el fracàs dels procediments de la investigació.

Existeixen diferents tipus d' ELISA segons l'organització dels antígens i anticossos:

- ELISA DIRECTA: quantifica antígens coneguts.
- ELISA INDIRECTA: busca i quantifica anticossos per a antígens coneguts.
- ELISA SANDWICH: busca i quantifica antígens.
- ELISA COMPETITIVA: quantifica antígens o anticossos



Il·lustració 39. Tipus d'ELISA

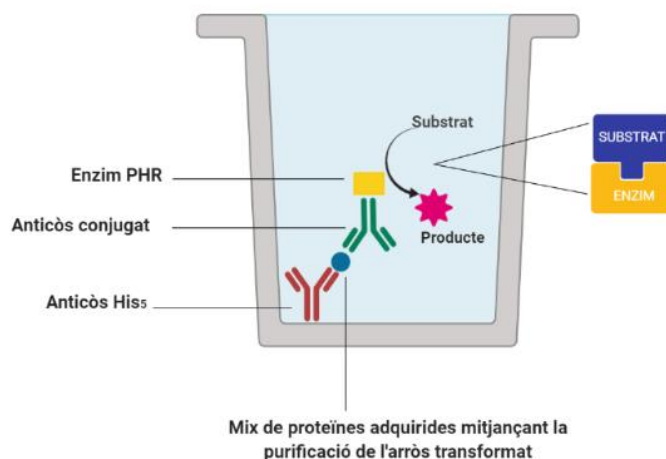
Tot i les diferències entre els tipus d' ELISA, cadascuna d' elles segueixen unes determinades tècniques per a l'èxit de la prova:

- Adsorció de l'antigen o anticòs a la base de la placa: normalment s'usa una multiplaca de 96 cel·les que pot estar constituïda per poliestirè (placa sòlida) o bé de clorur de polivinil (placa flexible). En el cas de la fixació d' un antigen la forma i mida de la placa és molt rellevant. Aquest pas es duu a terme per a fixar les immunoglobulines a la base de plàstic, això es produeix perquè la majoria de proteïnes s'adhereixen a aquest material per les interaccions hidròfobes entre ambdós medis. Es deixa en repòs durant tota la nit (o/n) per a l' efectivitat de la fixació de la proteïna a la base.
- Rentat: aquest es basa en eliminar els reactius que no s'han unit a la gradeta. Primerament s'aboca el contingut de cadascuna de les cel·les per, tot seguit afegir un buffer, és a dir un líquid tamponat, per a mantenir les condicions òptimes en la reacció antigen-anticòs. El procés de rentat es fa diversos cops.

- Bloqueig dels anticossos o antigens a la base: s'utilitza una substància que no reaccioni amb la resta de reactius de l' ELISA. Aquesta fase té com a objectiu omplir els buits que deixa l'antigen o anticòs fixat a la placa a fi d'eliminar la possibilitat d'unió d'altres molècules de no interès a la base.
- Combinació amb enzims: els reactius es conjuguen amb enzims en aquest tipus de tècnica. Aquests enzims han de unir-se a un substrat fluorogènic, és a dir, la formació del seu complex formarà la coloració de la mostra. La coloració és proporcional a la quantitat d'enzim fixat als reactius i a la concentració de producte en el medi.
- Lectura visual o espectrofotometria de la gradeta: com a producte de la reacció de catàlisi del substrat es produeix consegüentment la coloració de les cel·les. L'ELISA es pot llegir utilitzant un espectrofotòmetre o bé visualment.

En aquest cas s'usarà una ELISA Sandwich directa, que presentarà la següent estructura:

- Anticòs His₅: presenta afinitat al gen EtMIC, aquest és de producció animal, concretament del conill.
- Mix de proteïnes en dissolució que pot incloure l'antigen EtMIC. En cas de la seva presència formarà el complex antigen-anticòs.
En aquest tipus d'ELISA l'antigen presenta dues zones possibles d'unió a anticossos específics amb els quals presenta afinitat.
- Anticòs secundari conjugat a l'enzim PHR que presenta afinitat pel determinant antigènic no ocupat per l'anticòs ja unit a l'antigen, i produeix l'amplificació d'aquest.
- Substrat cromogènic: l'enzim el catalitza produint consegüentment la coloració de la mostra.



Il·lustració 40. Esquema ELISA Sandwich directa.

INTERPRETACIÓ D'UNA PLACA D'ELISA I DISTRIBUCIÓ DE LES MOSTRES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	M1	M1								
B	C2	C2	M2	M2								
C	C3	C3	M3	M3								
D	C4	C4	BI	BI								
E	C5	C5	BI	BI								
F	C6	C6	BI	BI								
G	C7	C7	BI	BI								
H	BI	BI	C+	C+								

- Blank (BI): valors que indiquen el mínim color (blanc) i si indiquen un color superior vol dir que la mostra conté el nostre anticòs, i en cas que la mostra tingui un resultat incolor, aquesta no inclou el nostre gen.
- Control positiu (C+): 50 μ l directament del gen (EtMIC)
- Mostres extreïdes de la planta d'arròs (M1-M3): les mostres s'obtenen de la purificació de DNA de les llavors d'arròs, extraient un mix de proteïnes (no se sap si hi ha el nostre gen)
- Corba (C1-C7) (proteïna purificada de EtMIC 100ng/ μ l): la corba de la ELISA es prepara fent la dilució salina de una mostra de EtMic purificada amb la màxima concentració possible. Realitzant aquesta corba s'estableixen uns valors en cada nivell (C1-C7) indicant en el resultat de les mostres per color quina concentració presenten aquestes.

Per a poder realitzar la tècnica ELISA es va fer servir el [8] **PROTOCOL ELISA**

5.2.2. LECTURA DE L'ELISA AMB ESPECTROFOTÒMETRE

La màquina usada per a la lectura de les gradetes de l' ELISA és espectrofotomètrica (BIO-RAD). Aquesta eina usa la longitud d'ona per a quantificar substàncies o bé microorganismes. Mitjançant la projecció d'un feix de llum monocromàtica a través de les mostres, mesura la quantitat de llum absorbida per aquestes, permetent informar sobre la naturalesa de la mostra i indicar quina quantitat de substància d' interès hi ha en l'analit.

Aquest està format per dues parts: espectròmetre que proporciona llum a una longitud d'ona específica i el fotòmetre que mesura la intensitat de la llum. A través de la quantitat de llum que l'analit absorbeix i l'aplicació de la llei de Beer, aquest és capaç d' establir la concentració de la mostra amb color.



Il·lustració 41. Espectrofotòmetre

5.3. DETECCIÓ DE LA PROTEÏNA AMB WESTERN BLOT

5.3.1. WESTERN BLOT

El Western Blot , també anomenat Immunoblot, és una tècnica immunològica que permet la immunodetecció i quantificació d'una proteïna específica en una mostra de sang o en un teixit. Fou descoberta per Towbin (et al.,1979). Com que la proteïna d'interès està continguda en la cèl·lula o teixit, s'ha de produir la lisi d'aquests. La lisi és el trencament de la membrana plasmàtica de la cèl·lula que produeix l'alliberament del material cel·lular. Les proteïnes, a més a més, són tractades en medis no òptims, consegüentment es produirà la ruptura de la seva estructura tridimensional (desnaturalització).

A cadascuna de les mostres se li afegeix l' anomenat tampó de càrrega. Aquest conté SDS (dodecilsulfat sòdic) i β mercaptoetanol o DTT (ditiotreitòl). Aquestes solucions tampó produeixen la desnaturalització de l'estructura secundària i l'aportació de càrrega negativa. A més a més, produeixen el trencament dels enllaços disulfur.

Aquests processos produeixen la possibilitat de separar per pes molecular les diferents proteïnes per a la seva identificació en l'electroforesi d'agarosa (SDS-PAGE) i la creació de zones d'agregació dels anticossos específics de producció animal (anticòs utilitzat en la tècnica ELISA) que les reconeixeran.

Les mostres de proteïna es tenyeixen amb tampons de càrrega de gel, que aportaran coloració per a facilitar la càrrega de les mostres en el gel. Tot i això, els colorants no ens donen claredat de quina de les bandes produïdes per les diferents proteïnes que s'analitzaran correspon a la d'interès.

El gel resultant de l'electroforesi s'ha de transmetre a una membrana de nitrocel·lulosa per a l'adició d'anticossos específics que reconeixin la proteïna buscada. Aquest procés de transferència es produeix de manera similar a la d'una electroforesi. Les proteïnes amb càrrega negativa es desplacen en direcció al pol positiu. Les proteïnes s'adhereixen a la membrana amb la mateixa posició que en el gel. Aquesta membrana i el gel s'intercalen entre dos filtres de paper que es mullen en una solució tampó de transferència estàndard. El muntatge es col·loca entre el càtode i l' ànode.

La membrana es tenyeix de Ponceau (vermell) o bé de Coomassie (blau). La tinció es dona per verificar que bona part del material proteic ha passat a la membrana.

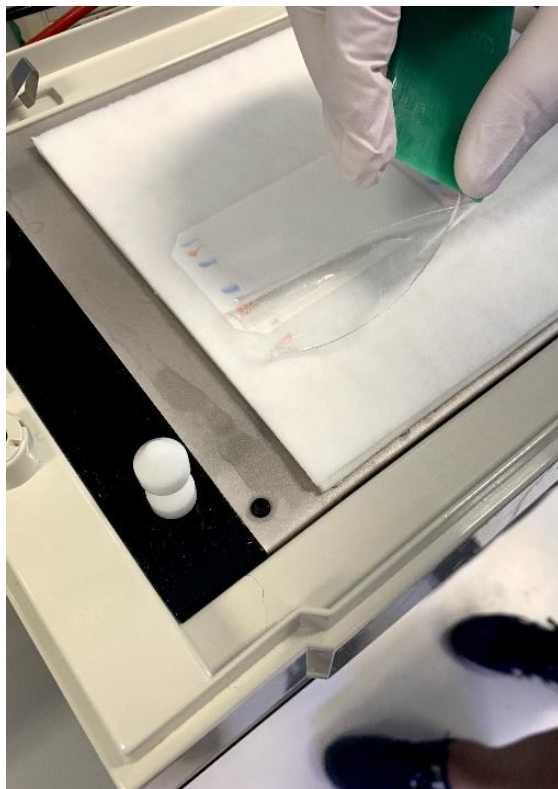
Després es renta la membrana per eliminar l' excedent de colorant. A continuació s'elabora el bloqueig de la membrana. Aquest es dona per a bloquejar les zones lliures després de la transferència que consegüentment poden dificultar la diferenciació

del complex antigen-anticòs d'interès. Els anticossos específics poden també unir-se a aquestes zones. La solució bloquejadora de membrana es realitza amb llet en pols i TBS-T.

A la membrana resultant es marcarà la proteïna d'interès amb els anticossos específics. Aquest traspàs del gel a la membrana es produeix perquè els anticossos no poden adherir-se la gel i per tant, no es podria detectar la presència de la proteïna buscada.

A més a més d'un anticòs específic també s'afegeix un anticòs secundari, que reconeix el primer i l'amplifica. L'anticòs secundari és d'origen animal. És a dir, és capaç de reconèixer tots els anticossos primaris produïts en l'animal d'on aquest s'ha extret. Aquest anticòs està unit a un enzim (HRP) que reacciona amb un substrat cromogènic, com el DAB. Quan es catalitza dona lloc a un producte amb coloració, que es diposita a la membrana, a la zona de l'anticòs.

Per a realitzar el Western se segueix el [9] **PROTOCOL DE PREPARACIÓ DE LES MOSTRES EN WESTERN BLOT I CÒRRER EL GEL** i el [10] **PROTOCOL WESTERN BLOT**



Il·lustració 42. Traspàs del gel a la membrana.



Il·lustració 43. Bloqueig de la membrana.

➤ SDS-PAGE

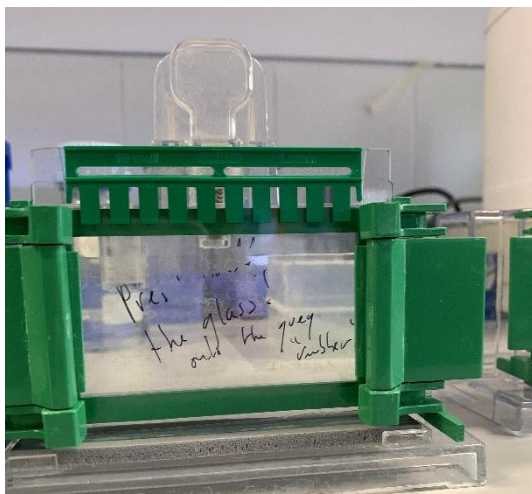
Aquest tipus d'electroforesi es produeix en gel de poliacrilamida verticalment i és una electroforesi bidimensional. Cada molècula es desplaça segons el camp elèctric que s'aporta al gel a una velocitat constant. La mobilitat electroforètica es defineix com la velocitat de desplaçament per unitat de camp elèctric. Segons el seu pes molecular aquestes tindran diferent mobilitat electroforètica.

GEL SEPARADOR	
DdH ₂ O	12mL
40% acrilamida	6.25mL
1.5 M Tris, pH 8.8	6.25mL
10% persulfat d'amoni	200 µl
TEMED	12.5 µl
SDS	250 µl

GEL CONCENTRADOR	
DdH ₂ O	5.8 mL
40% acrilamida	1.65 mL
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 mL
10% persulfat d'amoni	94 µl
TEMED	6.5 µl
SDS	100 µl

Per tal de poder realitzar l'electroforesi el muntatge del SDS-PAGE segueix el [11]

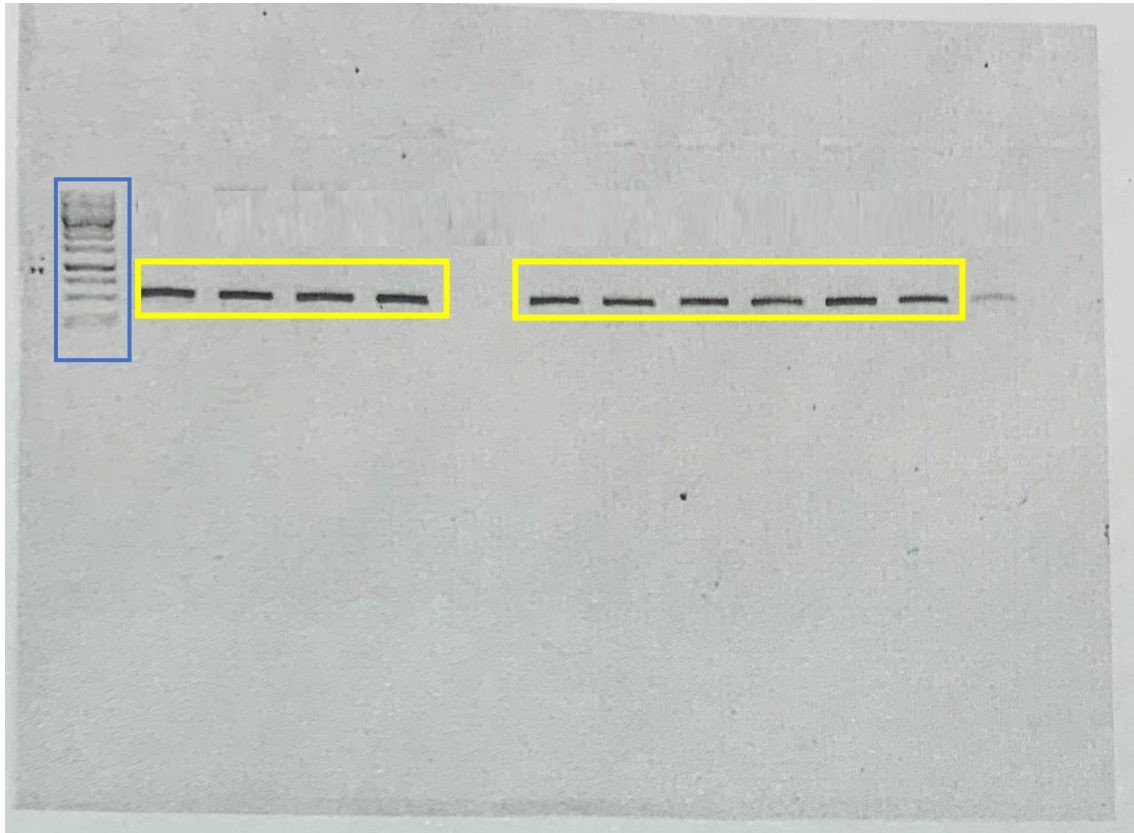
PROTOCOL DE MUNTATGE DEL SDS-PAGE



Il·lustració 44. Muntatge del SDS-PAGE

6. ANÀLISI DE RESULTATS

6.1. PCR



Il·lustració 45. PCR

A la PCR es produeix l'ampliació del gen EtMIC que es vol utilitzar per a transformar els embrions immadurs d'arròs.

Es pot observar en el resultat que les mostres (1-4) i (6-11) han realitzat la marca en l'alçada corresponent a 600-750bp segons el marcador molecular que prèviament hem seleccionat. Aquesta concorda amb el gen ampliat EtMIC, consegüentment aquest podrà codificar per a la vacuna contra la coccidiosi.

Contràriament, les mostres 5 i 12 no seran seleccionades per a la preparació d'or per al bombardeig, ja que ambdues no presenten la marca en la zona concordant a l'EtMIC o bé la presenten molt atenuades (12). Per tant, aquestes seran descartades.

6.2. DIGESTIÓ



Il·lustració 46. Digestió


A la digestió es produeix la separació del plasmidi del gen EtMIC per tal de demostrar que la introducció d'aquest gen ha estat efectiva i si ha estat duplicada amb el bacteri *E.coli* en el procés de creixement.

En el resultats produïts per l'electroforesi en gel, es poden observar dues bandes de les mides esperades en les mostres 3,4,6,7,8,9,10 que concorden amb el gen EtMIC (600bp) i del plasmidi pGEM T-easy (3kb); per tant, es podrà donar a lloc la posterior ampliació del gen per PCR i produir les mostres per a transformar els embrions.

D'altra banda es poden observar resultats on no s'ha introduït el gen, consegüentment les cèl·lules procariotes no es van transformar (1,2,5). També s'observa un segon tipus de resultat no favorable (11) en el qual s'ha introduït una seqüència de DNA que no correspon al gen d'interès. Per tant, potser si s'hagués utilitzat un altre tipus de mètode de sembra dels bacteris (diferenciació entre bacteris blancs i blaus) aquest resultat no hagués aparegut.

6.3. ELISA

	1	2	3	4
A	0,742	0,708	0,098	0,101
B	0,686	0,618	0,107	0,108
C	0,582	0,523	0,161	0,138
D	0,412	0,401	0,066	0,069
E	0,389	0,344	0,069	0,066
F	0,2	0,178	0,073	0,073
G	0,1	0,178	0,07	0,072
H	0,07	0,264	0,569	0,618

 OD de la corba C1-C7 a partir de la qual es calcularan les concentracions del gen.

 Blank

 Mostres

 Control positiu

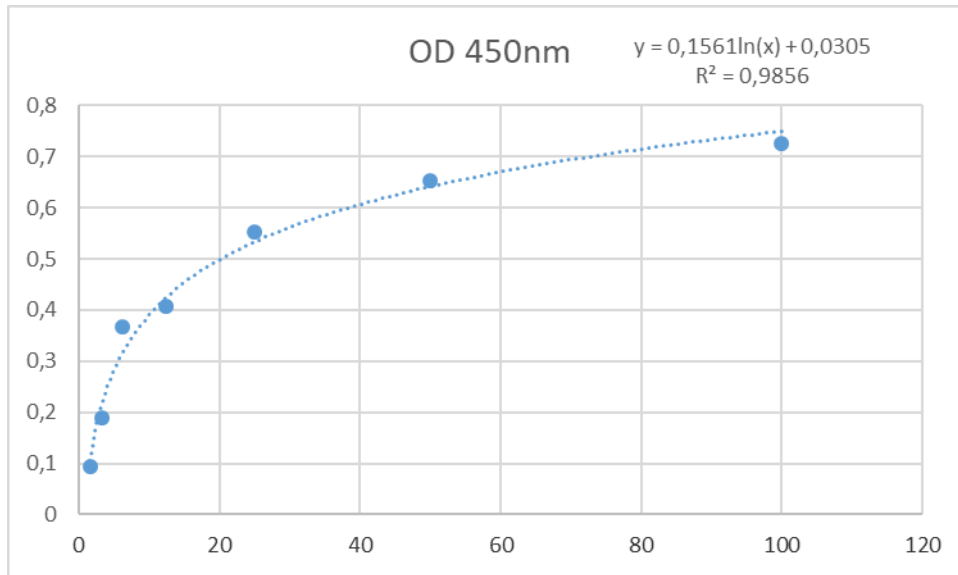
Mitjançant la tècnica ELISA es demostra que la proteïna s'ha expressat de manera efectiva en l'embrió d'arròs i que es plega correctament ja que és detectada per l'anticòs corresponent. Després de realitzar l'espectrofotometria es recullen les següents dades, on s'observa l'OD (densitat òptica) la qual es compararà amb la concentració teòrica de la corba per tal de poder calcular les concentracions del gen en les diferents mostres. Per tant, la tècnica també permet quantificar la concentració de proteïna (que és la nostra vacuna). Amb aquesta concentració es podrà establir la quantitat d'arròs necessari per a fer el tractament específic.

RELACIÓ CONCENTRACIONS I OD:

			ng/ μ L	OD 450nm
A	0,742	0,708	100	0,725
B	0,686	0,618	50	0,652
C	0,582	0,523	25	0,5525
D	0,412	0,401	12,5	0,4065
E	0,389	0,344	6,25	0,3665
F	0,2	0,178	3,25	0,189
G	0,1	0,09	1,625	0,095

Es relacionen els valors d'OD de la corba amb la concentració teòrica en ng/ μ L donant com a valor màxim de la corba 100 ng/ μ L. Es realitza la mitjana entre els valors de cadascuna de les files (A1-A2, B1-B2, C1-C2...), mitjançant aquests dos valors

s'elabora una gràfica en la qual es podran extrapolar dades per tal d'identificar la concentració de les mostres.



Il·lustració 47. Gràfic de relació d'OD amb concentració.

Aquesta gràfica relaciona l'OD (eix de les y) i la concentració de la mostra (eix de les X). Aquesta amb les dades anteriors descriu una corba i segueix una funció afí:

$$y: mx + n$$

- **m:** pendent
- **n:** l'ordenada en l'origen (coeficient de posició)

CONCENTRACIONS DE LES MOSTRES:

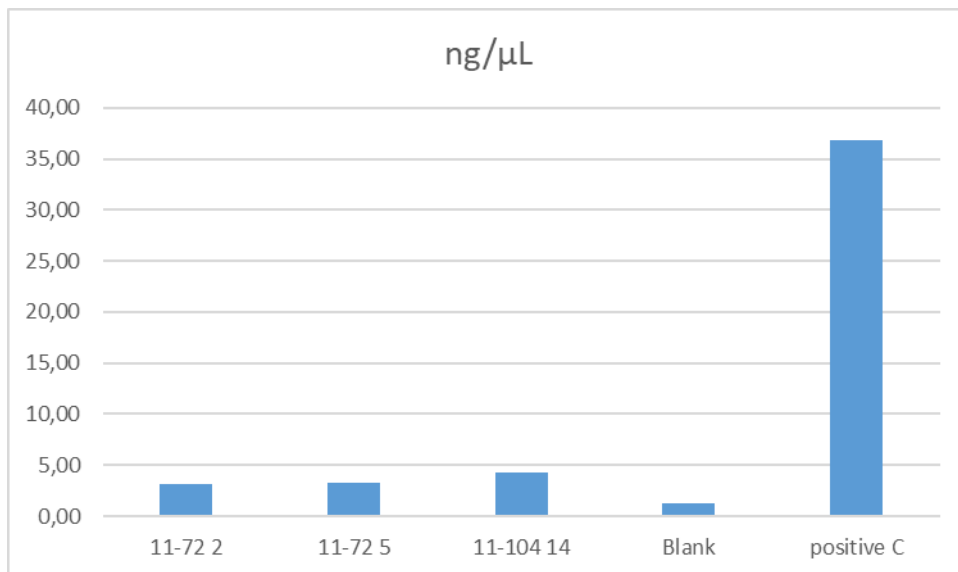
mostres	OD 450nm	ln(ng/μL)	1/2ng/μL	ng/μL
11-72 2	0,0995	0,44202434	1,55585361	3,11
11-72 5	0,1075	0,49327354	1,63766843	3,28
11-104 14	0,1495	0,76233184	2,14326815	4,29
Blank	0,0675	0,23702755	1,26747603	1,27
Control positiu	0,5935	3,6066624	36,8428804	36,84

Es realitza la mitjana entre les dues densitats òptiques que l'espectrofotometria ha recollit. Mitjançant la gràfica que relaciona l'OD i les concentracions de la corba es

poden extrapolar dades, és a dir, amb l'aïllament de la X en la funció es pot establir la concentració de cadascuna de les mostres.

- Y: mitjà entre ambdós OD
- M: $\ln(\text{ng}/\mu\text{L})$
- N: $1/2\text{ng}/\mu$

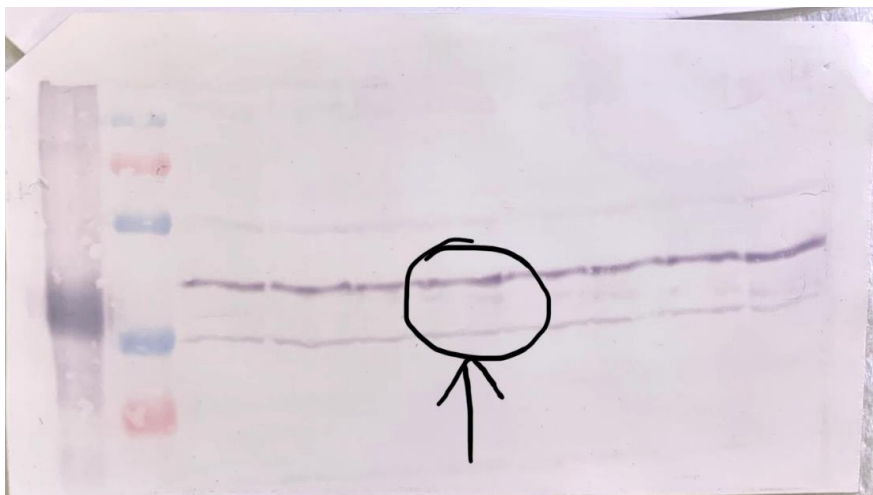
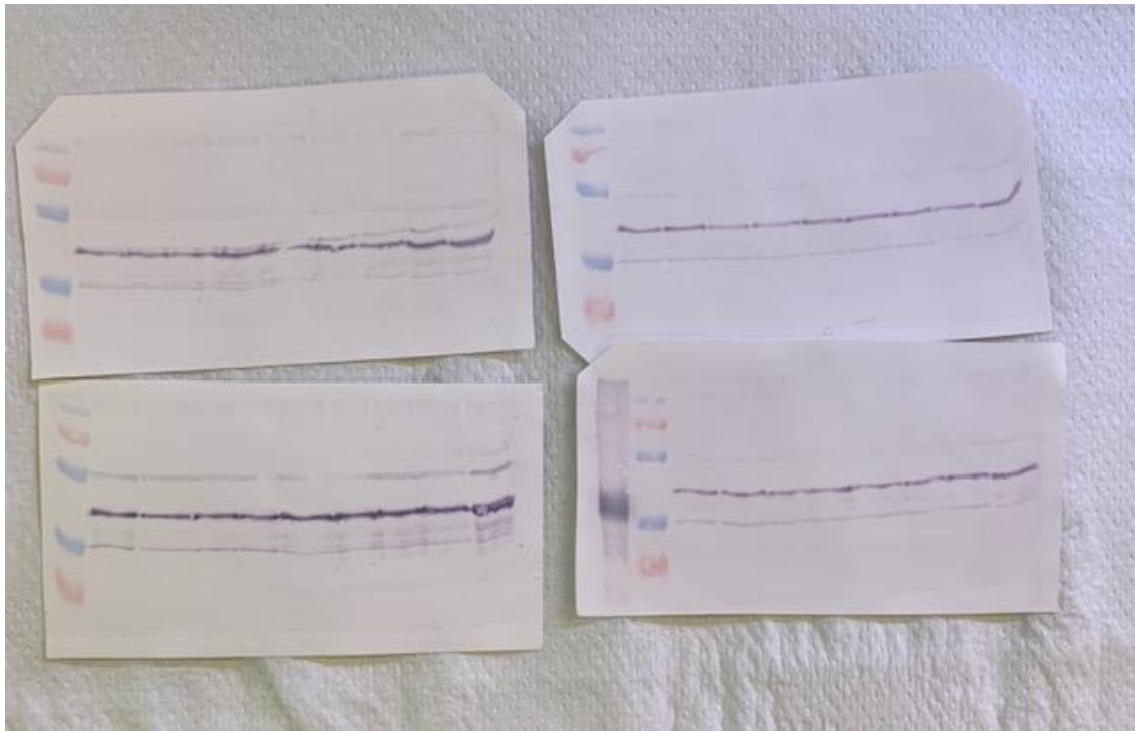
El resultat del càlcul de les 3 concentracions estableix que la mostra més concentrada és la 11-104 14 amb $4,29 \text{ ng}/\mu\text{L}$



Il·lustració 48. Gràfic de relació entre les concentracions i les mostres

En el gràfic de barres observem les concentracions de les 3 mostres calculades, del control positiu i del Blank. Les tres mostres sobrepassen al Blank cosa que demostra que el gen ha estat expressat i que la proteïna és funcional. Per tant, es poden establir quantes dosis de vacuna es podran produir.

6.4. WESTERN



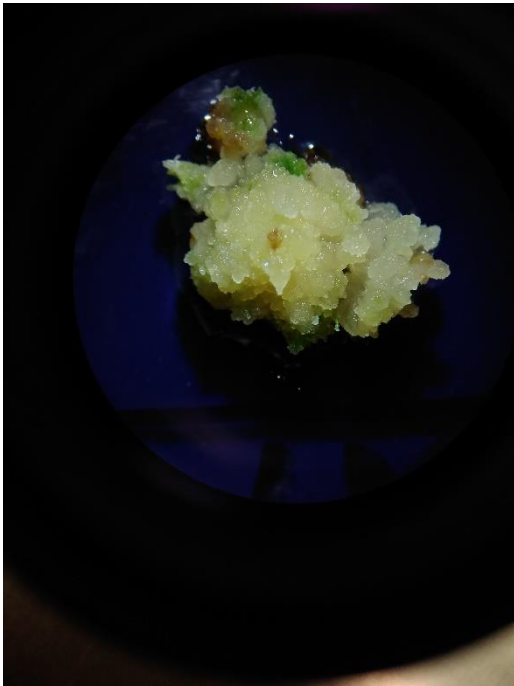
Il·lustració 49. WESTERN BLOT

Mitjançant la tècnica Western s'ha pogut observar que la marca ha aparegut en el mateix nivell que el control positiu, per tant coincideix amb el nivell esperat que indica el marcador.

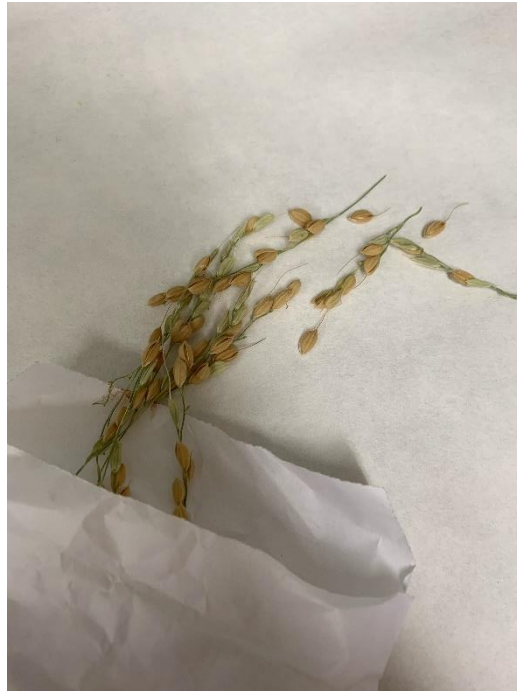
Consegüentment, es demostra que la proteïna té la mida adequada.

6.5. EMBRIOGÈNESI

La generació d'embrions somàtics als teixits de calls donarà lloc a la regeneració de la planta. En el cas que el call contingui un gen nou gràcies al procés de transformació, la planta regenerada serà transgènica i probablement produirà la proteïna esperada.



Il·lustració 50. Teixit de call en fase de regeneració



Il·lustració 51. Llavors seques d'arròs transgènic.

En aquest cas es pot observar que la planta ha generat call, i es va desenvolupar. Per tant mitjançant la tècnica Elisa es van analitzar diverses mostres per determinar la concentració de proteïna en les llavors d'arròs de la planta transgènica.

7. DISCUSSIÓ

Tot i que la mida de la cadena és la mateixa per al gen que hem d'expressar, la seva comparació amb uns altres resultats no seria certa. En la PCR, digestió i Western es determinen i classifiquen les mostres segons si la mida de la seva cadena correspon a la del gen d'interès. La mida en parell de bases ja es compara amb un marcador molecular de pes que es col·loca al primer pou en l'electroforesi de gel, aquest procés ja implica la discussió dels resultats i la seva comprovació. No es poden comparar dos resultats a més a més perquè segons l'encebador que es col·loca, els parells de bases (elongació de la cadena) canvia tot i que es parla del mateix gen, ja que es compararà amb el marcador molecular de pes que correspon al gen més l'encebador.

En canvi, l'ELISA es pot comparar amb altres resultats d'altres investigadors ja que amb aquesta s'estableix la concentració per mostra per tal de produir la vacuna comestible.

En el meu cas, es va produir a la mostra amb més concentració 4,29 ng/μL, consegüentment segons la relació que s'estableix amb la concentració de proteïna en quantitats de matèria superiors (25mg/kg) s'estableix que aproximadament amb 1kg de fulla d'arròs transgènic amb el gen es poden tractar a 10.000 aus de corral amb 3 dosis de vacuna.

D'altra banda segons altres investigacions (**Smith, et al 2019**) en concentracions d'antigen en massa de 1:1024 o bé 768 HAU per dosi. Amb 40g de fulla transgènica es poden produir 400 dosis. Per tant, amb 1 kg poden ser immunitzades 10.000 aus amb només una vacuna en aquest cas.

En conclusió, la quantitat de vacunes que es poden elaborar mitjançant les concentracions de proteïna expressada amb arròs transgènic és gairebé la mateixa que en aquesta investigació on s'utilitza **Nicotiana benthamiana** per tal d'expressar l'H6, però amb la diferència de la repartició d'una vacuna monovalent en 3 dosis.

8. PROPOSTA D'ADMINISTRACIÓ

La coccidiosi, com s'ha esmentat, és una malaltia que afecta majoritàriament les cries dels pollastres (***gallus gallus domesticus***). Aquesta, produïda pel protozou *Eimeria* causa un gran impacte econòmic mundial en l'indústria de les aus de corral; aproximadament s'estima que les pèrdues arriben als 3 milions de dòlars (Qi et al., 2013). Per a poder comprovar si la proteïna que expressa el nostre gen produeix l'aparició dels anticossos per tal de protegir els pollastres contra la malaltia, s'hauria d'elaborar un assaig científic on es subministraria la vacuna per a poder determinar la seva eficàcia.

Les vacunes que es produirien són de tipus comestible, és a dir elaborades mitjançant plantes (arròs), que contenen l'antigen immunitzant per tal de produir l'aparició d'anticossos específics (resposta immunitària) en l'au per a poder protegir-la i immunitzar-la.

Per cada dosi es necessitaran 0.08mg de la proteïna que expressa l'arròs transgènic transformat amb EtMIC. A cadascun dels pollets se li subministrarien 3 dosis distribuïdes en 3 setmanes, per analitzar possibles millores durant el desenvolupament de la malaltia.

S'elaborarien 4 grups, formats per 14 pollets en cadascun dels grups. Aquests es troben aïllats un dels altres per evitar contagis. La distribució per tal de poder donar a lloc a l'experiment és la següent:

GRUP 1	GRUP 2
GRUP 3	GRUP 4

- **GRUP 1:** infecció dels pollets amb ooquistes i vacunació amb la proteïna produïda per l'arròs transgènic.
- **GRUP 2:** infecció dels pollets amb ooquistes i administració del sèrum.
- **GRUP 3:** no infecció dels pollets i administració de sèrum.
- **GRUP 4:** replica del grup 1: infecció i vacunació amb la proteïna produïda per l'arròs transgènic.

S'administra sèrum en els grups no infectats per tal de produir la mateixa situació d'estrès que els pollastres vacunats

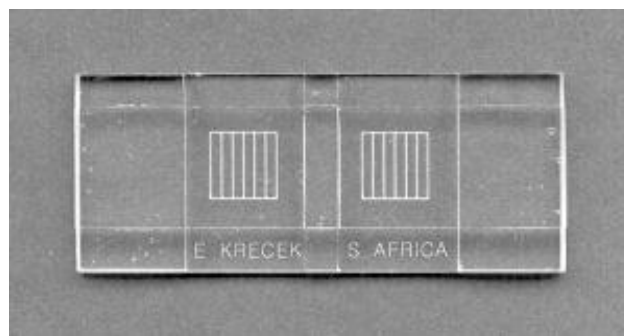
Durant els dies de l'experiment s'elaborarien els següents passos:

- Pes dels pollets: es pesen els pollets individualment anotant el resultat i el grup al qual pertanyen.
- Subministració de la primera dosi en els grups 1 i 2 i subministració de sèrum en els grups control.
- Infecció dels pollets: s'infecten els pollets dels grups 1 i 2 amb 30.000 ooquistes cadascun. Aquesta quantitat assegurarà l'aparició de la coccidiosi en aquests.
- Recompte d'ooquistes en excrements i pes dels pollets.
- Segona dosi i segona subministració de sèrum.
- Sacrifici de 3 pollets de cada grup, anàlisi dels excrements i dels cecs corresponents.
- Tercera subministració de la vacuna i el sèrum.
- Anàlisi dels excrements, del pes i per últim el sacrifici de tots els grups.

Cal recordar que és necessari també extreure una mostra de sang als pollastres per tal de determinar l'aparició de l'anticòs. Aquesta detecció es realitzaria mitjançant una ELISA.

RECOMPTE D'OOQUISTS

Pel recompte d'ooquistes s'utilitza la cambra de McMaster. Aquest estri s'utilitza per calcular la quantitat d'ooquistes per gram d'excrement. Està format per dues cambres amb una reixeta on es reapareix la mostra diluïda amb solució salina i mitjançant el microscopi es fa el recompte. Es compten els ooquistes per cada rectangle que forma la reixeta.



Il·lustració 52. McMaster

VISUALITZACIÓ DELS CECS

Després d'extreure els cecs a les aus, es comparen amb imatges de cecs completament infectats i s'estableixen valors del 0 al 4, donant el 0 als cecs que no presenten lesions i un 4 als cecs molt lesionats (*Johnson and Reid et al. 1970*).

Amb els resultats obtinguts sabríem si la vacuna ha protegit als pollastres infectats amb ooquistes d'*Eimeria* i si trobem diferències significatives amb els grups control. Aquestes diferències s'haurien de trobar tant en el recompte d'ooquistes en femtes com en les lesions dels cecs.

9. CONCLUSIÓ

En aquesta recerca s'ha pogut visualitzar com una planta d'arròs, tan senzilla en aparença, ha passat a ser quelcom beneficiós per a millorar la qualitat de vida de les aus de corral i per al progrés de la ciència i la biotecnologia. S'han observat cadascuna de les tècniques i mètodes específics que fan possible donar la vida als transgènics per tal de combatre una malaltia tan important i poc coneguda com és la coccidiosi.

Contribuir en una investigació, ser capaç de poder desenvolupar cadascuna d'aquestes tècniques m'han ajudat a formar-me no solament en l'àmbit acadèmic sinó en la capacitat de treballar en equip. He tingut l'honor de participar en cadascuna de les etapes del procés de transformació dels transgènics, i he estat capaç de realitzar les tasques adients, des d'entendre el funcionament d'una PCR i fer córrer el gel, passant pel procés de transformació de les cèl·lules competents, bombardejant, arribar a seleccionar els teixits de calls i finalment quantificant la concentració de les mostres. És a dir, tots i cadascun dels apartats que s'han explicat han estat procediments reals, experimentats en primera persona creant un vincle més proper amb aquesta investigació i consegüentment amb el treball que he realitzat.

El treball de laboratori no és tan senzill com es plasma en el paper. És un treball difícil i moltes vegades ple d'entrebancs que fan que les investigacions no siguin tan fàcils. Un d'aquests entrebancs el vaig poder experimentar. Durant el procés de la realització de la tècnica Western, el gel no va traspasar correctament la imatge a la membrana perquè l'energia que va subministrar l'elèctrode no va ser la correcta (només es van subministrar 14V, en canvi necessita 23V perquè es pogués realitzar correctament). Però malgrat aquest entrebanc, vam poder solucionar el problema tornant a repetir el procés de traspàs de la imatge a la membrana donant uns resultats favorables.

A mesura que s'avançava amb la investigació es va anar observant que les vacunes comestibles per a la coccidiosi resultaven molt més senzilles d'elaborar que les produïdes amb la recombinació dels antígens dels coccidis que donaven a lloc un gran gradient de resultats diferents (**Mohana Subramanian B et al. 2008**). Cal recordar que els esporozous són la fase d'invasió del paràsit, i que es torben a l'òrganul del complex apical. Algunes proteïnes de micronema són secretades per aquests esporozous. S'ha demostrat que mitjançant la recombinació d'aquestes proteïnes de micronema (EtMIC) es pot produir una vacuna candidata que protegeix les aus de corral en contra de la coccidiosi, ja que aquesta indueix l'aparició d'anticossos específics en l'animal. El nostre gen candidat, que es va introduir correctament en

l'arròs, produint la proteïna que es buscava, ens va apropar a la vacuna comestible i va confirmar dues de les hipòtesis plantejades a l'inici.

La planta transgènica d'arròs que expressava l'EtMIC es va trobar, mitjançant la tècnica ELISA, en una de les seves mostres procedents de la llavor (extracció de proteïnes) una concentració de proteïna elevada, concretament de 4,29 ng/μL. Aquesta concentració estableix que, si una llavor la té, amb 18 repeticions de la mostra es pot elaborar una dosi de la vacuna (cadascuna conté 0.08mg/μl). Consegüentment es pot deduir que la concentració d'antigen és elevada contra més quantitat de matèria orgànica transformada es pren. Per tant, es pot considerar que amb 1 kg de fulla es poden arribar a crear fins a 40.000 dosis, però cal recordar que per cada au s'ha de subministrar 3 dosis, i per tant es pot aplicar la vacuna a 13.333 aus de corral.

Aquestes dades estableixen que les vacunes comestibles per a usos veterinaris (en aquest cas especialment la coccidiosi) són menys costoses, ja que el procés de manufactura és més ràpid que la recombinació d'esporejats i els requisits d'esterilitat són menors que en vacunes per a humans (**Meeusen et al 2007**). A més a més aquestes vacunes asseguren la duració de la immunitat (**Kilany et al. 2016**) amb la qual cosa, a diferència de les vacunes comuns o els fàrmacs utilitzats per al tractament de la coccidiosi, que mantenen un constant control i subministració d'aquests a les aus de corral, les vacunes comestibles reduirien aquest cost en reduir el nombre de dosis i a més a més es reduiria l'estrès causat en les aus.

L'alternativa als fàrmacs que actualment s'utilitzen per al tractament de la coccidiosi encara continuen en desenvolupament, amb l'estudi per a l'elaboració d'una vacuna efectiva i menys costosa. Tot i que hem arribat fins aquí (l'antigen s'ha expressat correctament en la planta d'arròs i presenta concentracions òptimes per a una elaboració d'una vacuna econòmica), la falta de temps ha fet que no pugui arribar al pas culminat de la investigació: elaborar la vacuna i provar-la amb aus. Però, tot i aquesta falta de temps he pogut assolir tots els objectius que em vaig plantejar, i els resultats que he obtingut són encoratjadors per a continuar amb el desenvolupament d'aquesta vacuna. Com a conclusió s'ha demostrat que les plantes són capaces d'expressar gens externs sota unes condicions de control òptimes la qual cosa ajudarà a la creació d'una vacuna multivalent més econòmica contra la coccidiosi. L'arròs transgènic per tant, ha demostrat ser un gran medi per tal que en un futur, poder produir vacunes de tot tipus tant per a animals com per a humans.

10. REFERÈNCIES

➤ BIBLIOGRAFIA:

Prof. Dr. C. Rolando Felipe Ochoa Azze (2012) *TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS*. Finlay Ediciones.

H.S. Chawla (2009). *Introduction to Plant Biotechnology*. CRC Press

Bueno Torrens, D. (2011). *¿Para qué sirven los transgénicos?*. Barcelona: Universitat de Barcelona, Publicacions i Edicions.

➤ ARTICLES:

- Usha C. Gohil, Fridrun Podczek, Neil Turnbull. 2004. Investigations into the use of pregelatinised starch to develop powder-filled hard capsules. *International journal of pharmaceutics*. 51-63
- Tanja Smith. 2019. Efficacy of a plant-produced virus-like vaccine in chickens challenged with influenza A H6N2 virus. *Plant Biotechnology Journal*, pp 1-11.
- Kota Sathish. 2012. Plant expressed Coccidial antigen as potential vaccine candidates in protecting chicken against Coccidiosis. *Vaccine* 30. 4460-4464.
- Plantharayil Bharathan. 2014. Plant Based Edible Vaccines against Poultry Diseases: a Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 2 (5): 305 – 311.
- MohdHair-Bejo. 2015. Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. Hindawi Publishing Corporation
- Richard C. Laughlin. 2018. Plant-made E2 glycoprotein single-dose vaccine protects pigs against classical swine fever. *Plant Biotechnology Journal* pp 1-11.

➤ WEBGRAFIA:

https://en.wikipedia.org/wiki/Super_Optimal_Broth

<https://es.slideshare.net/bisbay83/replicacin-del-dna>

<https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/TransgenicosCoordinadorFBolivar.pdf>

<https://es.wikipedia.org/wiki/Bacteriófago>

<https://pdfs.semanticscholar.org/15a3/ec45944465cbe418f2b2710dd839540fb85a.pdf>

PCR I ELECTROFORESI: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

TRACKING DYES: <http://mcblabprotocols.com/techniques/tracking-dyes/>

GEL ELECTROFORESI:

<https://www.jove.com/video/3923/agarose-gel-electrophoresis-for-the-separation-of-dna-fragments>

DIGESTIÓ:

<http://fernandotuya.org/wp-content/uploads/2010/10/digestion-DNA.pdf>

<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>

<http://conogasi.org/articulos/metodo-digestion-por-enzimas-de-restriccion/>

LLIGACIÓ GEN-VECTOR: <http://conogasi.org/articulos/metodo-ligamiento-con-t4-adn-ligasa/>

TRANSFORMAR CÈL·LULES BACTERIANES:

<https://bioquimexperimental.files.wordpress.com/2009/08/transferencia-de-material-genc3a9tico-ii1.pdf>

https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2397/02.RCB_MATERIAL_METODOS.pdf?sequence=3&isAllowed=y

<https://bioquimexperimental.files.wordpress.com/2009/08/transformaci3b3n-bacteriana.pdf>

<https://www.mylabsource.com/learn/testing-procedures/cac12-transformation-technique/>

BOMBARDEIG

<http://agron-www.agron.iastate.edu/ptf/protocol/Gold%20Particle.pdf>

https://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE002055.pdf

<https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISDCH2014063009127253.pdf>

<http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v64n2/v64n2a6.pdf>

<http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=311>

<http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/biotec1/seminarios/Mentaberry%204%20Aplicaciones%20Agrobiotecnologia.pdf>

<http://www.geocities.ws/jaleo0/resistencia6.htm>

<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1003700300235>

http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442004000500007&script=sci_arttext&tIng=es

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100007

<https://studylib.es/doc/5072798/transformaci3b3n-y-mejoramiento-gen3e9tico-vegetal>

http://ocw.uniovi.es/pluginfile.php/2620/mod_resource/content/1/Transformacion_genetica.pdf

EMBRIOGÈNESI:

<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/263/237>

<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v22n1/v22n1a09.pdf>

<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a03.pdf>

http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo7_parte1.pdf

<https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/54>

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=vdw-JYBkra8C&oi=fnd&pg=PA35&dq=anatomia+arroz&ots=zD9Bu2866_&sig=ip2FYzui5IPizBiPDGxVbc_TNAw#v=onepage&q=anatomia%20arroz&f=false

PURIFICACIÓ DEL GEL:

<https://www.jove.com/science-education/5063/purificacin-del-gel?language=Spanish>

<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/43%20PURIFICACION%20ANALISIS%20DNA%20BACTERIANO.pdf>

<http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>

➤ **IMATGES:**

Il·lustració 2: <https://naukas.com/2010/12/06/molecular-pharming-plantas-que-vacunan/>

Il·lustració 3:

http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=20&Itemid=24

Il·lustració 4: http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema2/2_5monocot.htm

Il·lustració 5: <http://www.fao.org/3/y2778s/y2778s02.htm>

Il·lustració 6: <https://www.tri-tro.com/inicio/enfermedades-parasitarias-en-gallinas/coccidiosis-en-pollos/>

Il·lustració 7: <https://www.tri-tro.com/inicio/enfermedades-parasitarias-en-gallinas/coccidiosis-en-pollos/>

Il·lustració 15: <http://santicavision.info/best-apps-for-android/electroforesis-en-gel-de-agarosa.php>

Il·lustració 30: <http://pedrodanielalcivar.blogspot.com/2018/11/secuenciacion-directa-del-gen-de-la.html>

Il·lustració 32:

<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=958077244&topicorder=3&maxto=7>

Il·lustració 33: <http://nepad-abne.net/biotechnology/process-of-developing-genetically-modified-gm-crops/plant-transformation-using-particle-bombardment/>

Il·lustració 38: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antígeno>

Il·lustració 41:

http://www.biorad.com/webroot/web/images/lsr/products/microplate_systems/product_detail/global/680_microplate_reader.jpg

11. ANNEXOS

[1] PROTOCOL DE TALLAR I PURIFICAR LA BANDA D'UN GEL D'AGAROSA:

- Minimitza el volum d'agarosa descartant la quantitat màxima possible que no contingui cap banda.
- Pesa el gel en un tub i afegeix 3 volums del Buffer QG per 1 volum de gel (100mg-100µl)
- Incuba el gel a 50°C durant 10min. Per facilitar la fusió del gel, agita al vòrtex la mostra cada 2-3min.
- Després que el gel s'hagi fos comprova que el color de la mostra resultant sigui groga (en cas de presentar una coloració taronja afegeix 10 µl d'acetat de sodi 5pH). El color groc és degut a que el Buffer QG inclou un indicador de pH que atorga aquesta pigmentació en pHs òptims per a l'absorció del DNA a la membrana QIAquick.
- Afegeix 1 volum d'isopropanol a la mostra i mescla.
- Col·loca un filtre QIAquick en un tub de recollida de 2 ml.
- Per a filtrar el DNA, aboca la mostra en el filtre i centrifuga durant 1min.
- Descarta el sobrant i torna a col·locar el filtre en el tub de recollida.
- Per rentar afegeix 0.75ml de Buffer PE al filtre de QIAquick i centrifuga durant 1min.
- Aboca el sobrant i centrifuga el tub amb el filtre 1min.
- Traspassa el filtre en un tub de microcentrifuga de 1.5ml
- Per a l'elució del DNA, afegeix 50 µl de Buffer EB o bé H₂O al centre del filtre i centrifuga-ho 1min. Per a incrementar la concentració de DNA quan afegeixis el Buffer deixa incubar la mostra 1min abans de centrifugar.

[2] PROTOCOL DE LLIGACIÓ GEN-VECTOR**MATERIALS I MÈTODES**

<i>materials</i>	<i>quantitat (μl)</i>
<i>Buffer 2x Ligasa</i>	<i>5μl</i>
<i>pGEM T-easy</i>	<i>1μl</i>
<i>EtMIC</i>	(càlcul segons la longitud del gen)
<i>T4 DNA Ligasa</i>	<i>1μl</i>
<i>Aigua destilada</i>	<i>fins a 20 μl</i>

També es necessitaran: tubs eppendorf 0.5ml i micro-pipeta de 0-20 μl

➤ **CÀLCUL DE μl DE EtMIC**

Per tal de calcular els μl necessaris s'utilitza la següent equació:

Taula 2. d'equació per al càlcul de ng necessaris de EtMIC segons la proporció molar

$$\frac{50 \text{ ng pGEM-Teasy} \times \text{longitud del gen}}{\text{longitud del vector}} \times \text{gen: vector proporció molar} = \text{ng necessaris del gen}$$

➤ **Dades:**

La longitud del gen EtMIC és de 600bp i la del vector pGEM T-easy és de 3015bp

La concentració del vector és de 50ng/μl

El pGEM T-easy utilitza una proporció molar de l'ADN de control de 1:1

En aquest cas la proporció molar de l'EtMIC al vector pGEM T-easy és de 1:3

Concentració EtMIC 1ng/ μ l

$$\frac{50 \text{ ng pGEM-Teasy} \times 0.6 \text{ kb}}{3.0 \text{ kb}} \times \frac{1}{3} = 3,33 \text{ ng necessaris del gen}$$

EtMIC: 3,33ng x 1ng/ μ l = 3,33 μ l

LLIGACIÓ GEN-VECTOR

- En el tub eppendorf de 0.5ml es pipeteja el buffer 2x Ligasa tenint cura de no tocar les parets del nostre recipient amb la punta.
- A continuació s'aboquen la resta de líquids (de major a menor volum) seguint les mateixes indicacions, canviant de punta cada vegada que s'agafa un líquid diferent.
- Per finalitzar, amb aigua destil·lada es pipetegen 9,67 μ l i amb la mateixa pipeta es mesclen els líquids del recipient (prement el polsador ràpidament fent que succioni i torni a expulsar la mescla varies vegades).
- Per tal de produir un major nombre de gens introduïts, es deixa 3-4h a temperatura ambient (temperatura de l'habitació) i O/N (overnight) nevera (4°C)

NOTES: el canvi de temperatura es realitza perquè no se sap el moment ni la temperatura exactes en què el gen s'introduirà al vector (cada lligasa i gen necessiten una temperatura diferent). Per tant, es proven dues temperatures per assegurar la clonació (com més hores a temperatura de 4°C més transformats assegurarem)

[3] PROTOCOL DE HANAHAN: PREPARACIÓ DE CÈL·LULES**COMPETENTS (DH5 α)**

Materials:

Reactius i productes	Estris
DH5 α bacteris	Llaç metàl·lic
LB líquid i medi sòlid	Campana de flux laminar
Buffer Tfbll	Estris per esterilitzar
	Micro-pipeta
	Tubs de falcon
	Erlenmeyer
	Centrifugador
	Agitador

MÈTODES

Aquest procediment es va dur a terme en 3 dies:

Dia 1:

- Pren bacteris DH5 α del stock amb glicerol (-70°C) amb un llaç metàl·lic esterilitzat prèviament amb foc i traspassa-ho a un medi sòlid de LB (aquest és un dels medis principals per al creixement de bacteris).
- Creix o/n a 37°C els bacteris.

RECORDA: Sempre s'ha de treballar en condicions esterilitzades, per tant es recomana treballar en una campana de flux laminar (el flux prové de l'interior de la campana i treu a l'exterior l'aire)

Dia 2:

- Agafa una colònia de les que anteriorment hem fet créixer en el medi de LB amb una pipeta estèril i traspassa-la a un tub de falcon (50ml) amb 20 μ l de LB (líquid).
- Créixer o/n els bacteris a 37°C amb agitació.

Dia 3

- Afegeix 2ml de la colònia de bacteris a un Erlenmeyer de 100ml, 40 tubs Eppendorf de 2,5ml o bé dos tubs de falcon de 50ml i creix les bactèries en agitació a 37°C fins que la densitat òptica OD600 sigui de 0.4 (aprox. després de 2-3 hores), a continuació passa el flascó al recipient amb gel.
 - Traspassa 25ml a un tub de falcon esterilitzat de 50ml, centrifuga a 4800rpm durant 5 min. Descarta el líquid que no hagi precipitat.
 - Resuspèn el pellet delicadament amb 10ml del Buffer Tfbll (conté CaCl_2). Passa-ho al gel durant 5min.
 - Centrifuga a 4000rpm durant 5min, descarta el pellet.
 - Resuspèn el pellet amb 1ml del buffer Tfbll
- **PRESERVACIÓ DE LES CÈL·LULES COMPETENTS:**
 - j) Passa a gel el tub de falcon durant 15 min, realitza alíquotes de 100-150 μl en Eppendorfs de 2ml i enfonsa'ls en gel sec o refrigera les cèl·lules competents submergint els tubs a l'interior de nitrogen líquid.
 - k) Per preservar les cèl·lules es guarden a -70°C

[4] PREPARACIÓ DE PLAQUES LB I AMP

Taula 1. Medi ric amb Luria–Bertani (LB) sòlid

	Per a 500 ml (g)	Per a 1 litre (g)
Bacto triptona	5	10
Extracte de Llevat	2,5	5
NaCl	5	10
“Bacto agar”	7,5	15
Aigua destil·lada “milli-Q”	Fins a 500 ml	Fins a 1 litre

- Esterilitzar autoclavant i deixar refredar fins a 50-60°C.
- Repartir la solució 25ml/placa de 9cm ø
- Deixar solidificar sobre una superfície horitzontal

Nota : Pots afegir un 95% de l'aigua del medi ric amb LB, ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i afegir la resta d'aigua fins al volum desitjat.

- AJUSTACIÓ DEL PH EN UNA DISSOLUCIÓ DE LB

Es mesura amb l'Electrode (prèviament netejat amb aigua destil·lada per a una possible equivocació en la quantificació) el pH del medi de LB. Per tal de poder arribar als valors desitjats, es juga amb els àcids o bases.

- Base (KOH). Incrementa el valor del pH (medi més bàsic)
- Àcid (ClH). Disminueix el valor del pH (medi més àcid)

[5] PREPARACIÓ DE L'AMP EN CONCENTRACIONS 60 µG/µL

Per tal de poder dur a terme les plaques, l'ampicil·lina s'ha de trobar en unes concentracions de 60 µg/µl

Taula 2. Solució d'ampicil·lina (60 µg/µl)

	Per a 1ml	Per a 10ml
Ampicil·lina	0,06g	0,6g
Aigua destil·lada	994µl	9,4ml
Esterilitzar per filtració 0,22µm		
Repartir en tubs Eppendorf i guardar a -20°C (per a la següent preparació)		

[6] PROTOCOL DE CREIXEMENT BACTERIÀ EN MEDI LÍQUID DE LB.

Materials i reactius

Amp 100ng/ µl	50 µl
LB	50mL

- Tubs de centrifuga de tipus falcon de 50mL (3 unitats)
- Tubs de centrifuga de tipus falcon de 15mL (11 unitats)
- Placa LB i Amp amb colònies transformades
- Micropipeta i puntes

Mètode:

- En cadascun dels tres tubs de centrifuga de tipus falcon de 50mL s'aboquen 50mL de LB líquid i 50 µl d'Amp amb les concentracions indicades.
- En una gradeta de tubs de centrifugadora es col·loquen els 11 falcons de 15mL i es marquen amb un retolador el nom del gen i el nombre de casella de la qual es prepararà la colònia (40-50).
- Es prenen 5mL de la mescla preparada en els tubs de falcon, i es passa a cadascun dels tubs de 15mL. El material que no s'utilitza es guarda per a una possible utilització futura.
- Amb una micropipeta, s'ungeix la punta amb la colònia de la primera casella (sense arribar a tocar el gel) i s'allibera la punta al tub de falcon de 15mL marcat amb el mateix nombre que el de la casella.
- Aquest procés es repeteix amb cadascuna de les caselles i tubs de falcon de 15mL.
- Finalment la gradeta amb els tubs s'introdueix a la incubadora 16h a 37°C per al creixement de les bactèries.
- Per comprovar la correcta proliferació de les bactèries s'observa que després de la incubació o/ el medi resultant és molt més tèrbol.

[7]PROTOCOL DE LA GOLD PREPARATION

- A) Pesa 15mg de partícules d'or i passa-ho a un tub de centrifuga 1.5mL
- B) A l'interior de la campana de flux laminar afegeix 500 µl d'etanol 100% i sonica-ho en un bany ultrasònic durant 15 segons.
- C) Repòs de tub perquè les partícules s'assentin (30min)
- D) Centrifuga durant 1min i aboca l' etanol sobrant.
- E) Afegeix 1ml d'aigua per al rentat de la mostra. A continuació amb el vòrtex agita el contingut per a la resuspensió del pellet. Deixa de nou en repòs perquè s'assentin les partícules d'or.
- F) Centrifuga 1 minut a 300rpm i repeteix el procés de resuspensió del pellet. Finalment, al tercer cop, centrifuga a 5000rpm durant 15 segons.
- G) Després de l'últim rentat afegeix 500 µl d'aigua destil·lada. Posa la mostra en el bany ultrasònic durant 15 segons i a continuació fica la mostra al vòrtex per a la seva contínua agitació. Deixeu trontollar el tub en aquest ajust mentre l'obriu i poseu la unitat d'or rentada per a l'emmagatzematge.

Preparació de 1X tubs de preparació d'or:

- Per cada tub de 10X preparat en els anteriors passos prepara 10 tubs de centrifugació de 2ml. Mentre el tub de 10X continua en agitació traspasa 25 µl de la suspensió d'or a cadascun dels 10 tubs. Repeteix el traspàs dels 25 µl a cadascun dels tubs per obtenir finalment, 1.5mg d'or en 50 µl d'aigua destil·lada en concentració 1X. Congela els tubs obtinguts a -20°C per a la seva conservació fins a la seva utilització per a l'enllaçament amb el DNA.
- **REVESTIMENT DE L'OR AMB EL DNA PLASMÍDIC**
- El dia del bombardeig treu un dels tubs de 1X del congelador i col·loca'l en el bany ultrasònic 15 segons. A la campana de flux afegeix 20 µl del DNA plasmídic. Posa la mostra al vòrtex. A continuació afegeix 50 µl de CaCl₂. Amb la mateixa punta, succiona la mostra amunt i avall 3 vegades i col·loca la mostra al vòrtex i a velocitat baixa. Afegeix 20 µl d'espermidina. Espera 30 segons i tanca el tub i posa-ho al vòrtex de nou. Deixa sacsejant el tub durant 10min.

- Treu la mostra del vòrtex i espera uns minuts fins que l'or precipiti. Centrifuga 15 segons a 5000rpm i pipeteja el sobrant. Afegeix 250 µl d'etanol 100% del congelador per a la resuspensió del pellet. Posa la mostra al vòrtex. Sacseja el tub fins que l'or aconseguixi una consistència llisa. Deixa en repòs el tub fins que l'or es torni a estabilitzar. Centrifuga 15 segons a 5000rpm i succiona el sobrant amb la micropipeta i afegeix 120140 µl 100% d'etanol fred. Posa la mostra al vòrtex per assegurar la suspensió de l'or.
- Distribueix 10 µl de la mostra final sobre la làmina transportadora i es deixa.

Recorda que l'etanol s'evapora ràpidament, per tant has de tenir cura de sempre tapar la mostra.

[8] PROTOCOL ELISA**PREPARACIÓ DE L'ANTICÒS**

$$\text{Anticòs His}_5 (100\text{ng}) = \frac{1\text{ng}}{\text{ml}} = \frac{1\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \frac{1000\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

$$\frac{\mu\text{l}}{1000\text{ng}} \times \frac{1\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 100\mu\text{l} = \mathbf{0,1\mu\text{l en 100ml}}$$

0,1 x 40 (espais de la ELISA que ocuparem) = **4μl en 3996ml PBS (3:40-5:40)**

- Afegeix 100ml de l'anticòs en PBS i incuba-ho 2h a 37°C a la incubadora.
- Afegeix solució de bloqueig 2,5% BSA en PBS-T
 $2,5\text{g}/100\text{ml} \times 4,5\text{ml} = 0,11\text{g BSA en 4,5ml PBS-T}$
 Incuba-ho a 4°C (nevera) **o/n**
- Renta la placa ELISA amb 200μl PBS-T amb la micro-pipeta multicanal, 5 vegades.

Nota : El procés de rentat de les plaques consta de:

- Abocament de PBS-T en un canal
- Asseguració de les puntes en la pipeta multicanal i succió del líquid
- Abocament del líquid amb un cop sec
- Localització de bombolles formades en l'abocament
- Trencament de les bombolles per cops de la placa sobre un paper (els cops han de ser secs i forts, la placa s'ha de girar de manera que els espais quedin mirant el paper).

El pas de trencat de les bombolles és indispensable degut a que si no s'eliminen la ELISA pot quedar defectuosa (els resultats no s'observen amb claredat).

- Amb la micro-pipeta extraiem 50 μl de blank (buffer extracció de proteïna) i l'aboquem suaument en els espais C1.
- Extraiem 55μl de blank i el soltem dels espais C2 a els B1 de la columna 1 i 2.
- Amb la micro-pipeta multicanal succionem 55 μl de la proteïna purificada de concentracions 100ng/ μl i l'aboquem en ambdós espais C1

g) Per a realitzar la dilució salina que donailloc a la corba de l' ELISA agafem amb la micro-pipeta multicanal (amb només dos puntes) els 55 µl que anteriorment havíem abocat en els espais C1 i passem aquesta quantitat als C2. Amb la mateixa micropipeta tornem a extraure 55 µl dels espais C2 i es passen als C3. Aquest procés es continua fins als espais C7. Els 55 µl finals que extraiem de les caselles C7 es llancen amb les puntes, formant així una dilució de la concentració de la mostra purificada.

h) Incubar 2h a 37°C a l'estufa

i) Rentar la placa amb 200µl PBS-Tween x6

j) PREPARACIÓ DE MOSTRES DE EtMIC (1:2000) 2,5% BSA

2,5g/100ml x 4ml= **0,10g BSA en 4ml PBS-T + 2µl EtMic**

RECORDA: Les mostres de la ELISA són un mix de proteïnes (no sabem si contenen EtMic). L'Anti-EtMic (His₅) es un anticòs el qual detectarà la presència, en cas de ser-hi, del nostre gen EtMic.

k) Aboquem 50µl en les mostres i la corba

l) Rentar la placa amb 200µl PBS-Tween x6

m) PREPARACIÓ Anticòs conjugat (1:25000)

25ml de PBS-T

0,6B BSA

1µl anti anti EtMic + enzim

} afegir 50µl a cada mostra i corba

n) Incubar 2h a 37°C

o) Rentar amb 200µl de PBS-Tween x6 vegades

p) Afegim 100 µl de substrat a C1-C7 i M1-M3

q) Posar la placa en fosc 30 min (es tapa la placa amb paper d'alumini)

Nota : La placa es fica en fosc ja que el substrat es degrada amb la llum. Passats els 30min les mostres i la corba ja hauran fet la tinció degut a la reacció del enzim i el substrat.

L'enzim PHR es procedent del rave rusticà, el qual conjugat amb un substrat determinat produeix la coloració.

r) Lectura de la ELISA a la màquina de lectura de micro-plaques BIO-RAD

[9] PROTOCOL DE PREPARACIÓ DE LES MOSTRES EN WESTERN BLOT I CÓRRER EL GEL

- A cadascuna de les mostres de proteïna (24 µl) se li afegeix 6 µl de tampó de ruptura 5X i 10 µl de Laemmli buffer (aporta coloració blava a les mostres)
- Es col·loquen les mostres durant 5min a 95°C en un termomixer.
- Es retira cautelosament el pinte del gel i els separadors. Subjectant en vertical a la cubeta d'electroforesi els vidres i el gel.
- S'emplenen les càmeres superior i inferior de la cubeta d'electroforesi amb tampó d'electroforesi, fins que entri en contacte amb ambdós extrems del gel.
- Es carreguen les mostres en els pous i el marcador molecular amb una micropipeta.
- Es connecten els cables de la cubeta a una font de corrent.
- S'apliquen 200V fins que la banda blava de les mostres arribi a l'extrem inferior del gel, aproximadament el procés tarda 45min.
- Se separen les plaques de vidre amb l'ajuda d'una espàtula i s'extreu el gel, vigilant de no invertir la seva orientació.

[10] PROTOCOL WESTERN BLOT

- Es col·loquen els filtres de paper en Buffer de transferència 1X durant 5min per a humitejar-los. S'utilitza aquest buffer sense SDS.
- S'extreu el primer filtre i es col·loca damunt l'elèctrode positiu (base). Es passa un corró per la superfície del filtre per tal d'eliminar l'excedent de tampó.
- Es col·loca la membrana damunt del primer filtre.
- S'agafa el gel extret dels vidres i es col·loca al centre de la membrana.
- S'extreu el segon filtre i es disposa sobre el complex. Amb el corró s'elimina l'excedent de buffer. Es tapa amb el segon electrode (negatiu) i es dona corrent a l'electrotransferència.
- Es transfereix el gel a la membrana durant 45min a 32V.
- Es remou el gel i es traspasa la membrana a un recipient amb un agitador de safata (moviment de balanceig) i s'afegeix Ponceau (colorant vermell) fins a cobrir la superfície de la membrana. Mantenir el Ponceau 10 min. Descarta el colorant.
- A continuació es renta el Ponceau amb TBS-T durant 10 min més. No s'han de treure els recipients de l'agitador de safata. S'aboca el TBS-T després del temps.
- Es bloqueja la membrana afegint llet en pols 5% en TBS-T durant 45min. Abocar la dissolució.
- Es renta amb TBS-T durant 2min i es descarta.
- S'afegeix l'anticòs primari a 4°C durant tota la nit (o/n) en agitació.

PREPARACIÓ DEL ANTICÒS PRIMARI

L'anticòs es prepara a concentracions de 1:1.000 µl en 5% de BSA i TBS-T. També s'hi afegeix 0.1% de NaN₃, el qual es molt tòxic.

- Aboca la solució de l'anticòs primari i renta la membrana tres cops 10 min cadascun (descartant el sobrant cada cop que es torni a realitzar).
- Afegeix l'anticòs secundari durant 45min.

PREPARACIÓ DEL ANTICÒS SECUNDARI

L'anticòs es prepara a concentracions de 1:10.000 en 2% de llet en TBS-T.

- Renta amb TBS-T tres cops 10min cadascun
- Visualitza els resultats en una ECL

[11] PROTOCOL DE MUNTATGE DEL SDS-PAGE

- Es fixen els dos vidres d'1.5mm (un dels quals és més rebaixat que l'altre) amb els dos separadors en vertical entre aquests i a ambdós costats.
- Introdueix el "Sandwich" en el suport formador de gels i subjecta el conjunt. Inverteix el suport i segella els vidres amb parafilm per evitar un possible vessament de gel líquid.
- Amb una micropipeta omple suaument amb el gel separador els espais dels vidres deixant 3 cm de marge superior del vidre escurçat. Trencar les bombolles amb la punta de la micropipeta.
- Deixar que aquest solidifiqui i a continuació afegeix a l'espai on faci falta gel concentrador per arribar al límit del vidre. Abans que solidifiqui col·loca el "pinte" que formarà els pous del gel.